

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica



**DESARROLLO GALÉNICO DE
MICROEMULSIONES PARA LA ADMINISTRACIÓN
TRANSDÉRMICA DE NIFEDIPINO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

David Castro Moreno

Bajo la dirección del doctor
José Luis Lastres García

Madrid, 2002

ISBN: 84-669-2025-0



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5317339907

Título: Desarrollo galénico de microemulsiones para la administración transdérmica de nifedipino

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por:

DAVID CASTRO MORENO

Director:

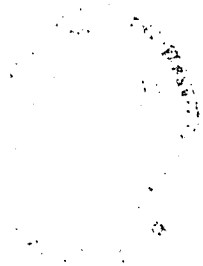
Dr. D. José Luis Lastres García

Madrid, 2002



620199363

i2954098



ÍNDICE

OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO	3
 PARTE TEÓRICA	
 CAPÍTULO I. NIFEDIPINO	9
1.1. Descripción	9
1.2. Estructura	9
1.3. Propiedades fisico-químicas	9
1.4. Acción farmacológica del nifedipino	10
1.4.1. <i>Mecanismo de acción</i>	10
1.4.2. <i>Propiedades farmacodinámicas</i>	12
1.4.2.1. <i>Efectos en las células cardíacas</i>	12
1.4.2.2. <i>Efectos hemodinámicos</i>	12
1.4.3. <i>Biofarmacia y farmacocinética</i>	13
1.4.4. <i>Efectos adversos</i>	15
1.5. Terapia y administración	15
1.6. Otros usos terapéuticos	16
1.7. Precauciones	16
1.8. Interacciones	17
 CAPÍTULO II. ABSORCIÓN TRANSDÉRMICA DE FÁRMACOS	21
2.1. Introducción	21
2.2. Anatomía y composición bioquímica de la piel	22
2.2.1. <i>Estructura</i>	22
2.2.2. <i>Composición bioquímica de la piel</i>	24
2.2.3. <i>Sistema circulatorio de la piel</i>	25
2.2.4. <i>Funciones de la piel</i>	26
2.3. Vías de absorción a través de la piel	28
2.3.1. <i>Absorción a través de los apéndices</i>	29
2.3.2. <i>Absorción transepidermal</i>	29
2.4. Factores que afectan a la absorción percutánea de fármacos	30
2.4.1. <i>Factores fisiológicos y patológicos</i>	30
2.4.2. <i>Factores fisico-químicos que influyen en el proceso de absorción</i>	32
2.4.3. <i>Características de la formulación</i>	34

2.5. Mejora de la absorción a través de la piel	36
2.5.1. <i>Clasificación de los métodos empleados para incrementar la absorción de fármacos a través de la piel</i>	37
2.5.2. <i>Empleo de formas farmacéuticas o/y dispositivos terapéuticos para mejorar la absorción transdérmica de fármacos</i>	44
2.6. Cinéticas de absorción	48
2.6.1. <i>Dosis finitas</i>	48
2.6.2. <i>Dosis infinitas</i>	50
2.7. Métodos para la determinación de la absorción percutánea in vivo	57
2.7.1. <i>Método de excreción urinaria.</i>	57
2.7.2. <i>Método de balance de masas</i>	60
2.7.3. <i>Método basado en el desprendimiento de las capas que constituyen el estrato córneo ó "Stripping method"</i>	61
2.8. Métodos para la determinación de la absorción percutánea in vitro	62
2.8.1. <i>Piel humana</i>	62
2.8.2. <i>Modelos de piel humana</i>	63
2.8.3. <i>Preparación de la piel</i>	65
2.8.4. <i>Conservación de la piel y validación</i>	67
2.8.5. <i>Celdas de difusión utilizadas en los estudios de absorción in vitro</i>	68
2.8.6. <i>Correlación in vitro-in vivo</i>	76
 CAPÍTULO III. SISTEMAS DISPERSOS	 81
3.1. Introducción	81
3.2. Clasificación de los sistemas dispersos	81
3.3. Utilización de sistemas dispersos en farmacia	82
3.4. Microemulsiones	83
3.4.1. <i>Definición</i>	83
3.4.2. <i>Diferencias entre la microemulsión y otros sistemas dispersos coloidales</i>	84
3.4.3. <i>Teoría sobre la formación de microemulsiones</i>	85
3.4.4. <i>Diagramas de fases</i>	86
3.4.5. <i>Formulación de microemulsiones</i>	89
3.4.6. <i>Estructura y caracterización de las microemulsiones</i>	92
3.4.7. <i>Estabilidad de las microemulsiones. Estudios de estabilidad</i>	94
3.4.8. <i>Microemulsiones como sistemas de liberación de fármacos</i>	96

PARTE EXPERIMENTAL

CAPÍTULO IV. ESTUDIOS Y CARACTERIZACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO	105
4.1. Métodos analíticos cualitativos	105
4.1.1. <i>Calorimetría diferencial de barrido (DSC)</i>	105
4.1.2. <i>Difracción de rayos X (DRX)</i>	106
4.1.3. <i>Espectroscopía de absorción infrarroja</i>	108
4.1.4. <i>Espectrofotometría convencional UV/Visible</i>	109
4.1.5. <i>Espectrofotometría UV/Visible de primera derivada</i>	111
4.1.6. <i>Cromatografía de líquidos de alta eficacia (H.P.L.C.)</i>	112
4.1.7. <i>Cromatografía en capa fina</i>	113
4.2. Métodos analíticos cuantitativos	114
4.2.1. <i>Espectrofotometría convencional UV/Visible</i>	114
4.2.2. <i>Espectrofotometría UV/Visible de primera derivada</i>	115
4.2.3. <i>Cromatografía de líquidos de alta eficacia (H.P.L.C.)</i>	115
4.2.4. <i>Validación de los procedimientos analíticos</i>	115
4.3. Características físicas y fisico-químicas del principio activo	122
4.3.1. <i>Punto de fusión</i>	122
4.3.2. <i>Higroscopicidad</i>	123
4.3.3. <i>Coefficiente de reparto (P) octanol/agua del nifedipino</i>	125
4.3.4. <i>Determinación del pH de máxima estabilidad del nifedipino en solución acuosa</i>	127
4.3.5. <i>Solubilidad del nifedipino en soluciones acuosas de distintos pH</i>	128
4.3.6. <i>Estudios y determinación de coeficientes de solubilidad del nifedipino en solventes y sistemas de solventes</i>	129
4.4. Estudios de estabilidad del nifedipino	133
4.4.1. <i>Estabilidad a la temperatura</i>	133
4.4.2. <i>Estabilidad a la luz</i>	135
4.4.2.1. <i>Estabilidad del nifedipino (materia prima) a la luz</i>	136
4.4.2.2. <i>Estabilidad de soluciones acuosas de nifedipino de distintos pH a la luz de día</i>	149
4.5. Tamaño y forma del nifedipino	151
 CAPÍTULO V. MICROEMULSIONES MÚLTIPLES O/A/O DE NIFEDIPINO	 155
5.1. Microemulsiones primarias o/a de nifedipino	156
5.1.1. <i>Determinación del volumen molecular del miristato de isopropilo</i>	156

5.1.2. Determinación de la polaridad relativa del miristato de isopropilo	158
5.1.3. Microemulsiones primarias o/a constituidas por IPM, Tween® 80 y agua	159
5.1.3.1. Componentes de la microemulsión primaria o/a	159
5.1.3.2. Diseño de microemulsiones primarias o/a	160
5.1.4. Microemulsiones primarias o/a constituidas por IPM/Brij® 96/agua	163
5.1.4.1. Componentes de la microemulsión primaria o/a	163
5.1.4.2. Diseño de microemulsiones primarias o/a	164
5.1.4.3. Determinación de la temperatura de inversión de fases en microemulsiones constituidas por IPM/ Brij® 96/agua	165
5.1.4.4. Solubilización de nifedipino en soluciones micelares Brij®96/agua y microemulsiones IPM/ Brij® 96/agua	167
5.1.4.5. Incorporación de nifedipino a la microemulsión IPM/ Brij® 96/agua	170
5.1.5. Microemulsiones primarias constituidas por IPM, Brij® 96, sorbitol 70% y agua	171
5.1.5.1 Componentes de las microemulsiones primarias o/a	172
5.1.5.2 Diseño de microemulsiones primarias o/a	173
5.1.6. Microemulsiones primarias IPM, Brij® 96, polietilenglicol 400 y agua	177
5.1.6.1- Componentes de la microemulsión primaria o/a	177
5.1.6.2. Diseño de microemulsiones primarias o/a	178
5.1.6.3. Determinación de la temperatura de inversión de fases en microemulsiones o/a	
5.1.6.4. Solubilización de nifedipino en soluciones micelares Brij® 96/PEG 400/agua y microemulsiones IPM/ Brij® 96/PEG 400/agua	182
5.1.6.5. Incorporación de nifedipino en la microemulsión primaria o/a	184
5.1.7. Microemulsiones primarias constituidas por IPM/Brij® 96/propilenglicol/agua	185
5.1.7.1 Componentes de las microemulsiones primarias o/a	185
5.1.7.2. Diseño de microemulsiones primarias o/a	186
5.1.7.3. Determinación de la temperatura de inversión de fases en microemulsiones o/a	190
5.1.7.4. Solubilización de nifedipino en soluciones micelares Brij® 96/propilenglicol/agua y microemulsiones IPM/ Brij® 96/propilenglicol/agua	191
5.1.7.5. Incorporación de nifedipino en la microemulsiones primaria o/a	193
5.1.8. Reología de las microemulsiones IPM/ Brij® 96/propilenglicol/agua	194
5.1.8.1. Influencia de la relación Brij® 96/propilenglicol sobre el comportamiento reológico de las microemulsiones o/a	194

<i>5.1.8.2. Influencia del contenido total Brij® 96/propilenglicol sobre el comportamiento reológico de las microemulsiones o/a</i>	<i>197</i>
<i>5.1.8.3. Influencia del contenido en fase interna sobre el comportamiento reológico de las microemulsiones o/a</i>	<i>198</i>
<i>5.1.9. Estudio del tamaño de gotícula de la fase interna de las microemulsiones IPM/ Brij® 96/propilenglicol/agua</i>	<i>200</i>
<i>5.1.9.1. Influencia de la relación Brij® 96/propilenglicol sobre el tamaño de gotícula de las microemulsiones o/a</i>	<i>200</i>
<i>5.1.9.2. Influencia del contenido total Brij® 96/propilenglicol sobre el tamaño de gotícula de las microemulsiones o/a</i>	<i>204</i>
<i>5.1.9.3. Influencia del contenido en fase interna sobre el tamaño de gotícula de las microemulsiones o/a</i>	<i>205</i>
<i>5.2. Múltiples microemulsiones o/a/o constituidas por microemulsión primaria o/a, Brij® 96 y IPM</i>	<i>206</i>
<i>5.2.1. Componentes de las microemulsiones múltiples o/a/o</i>	<i>206</i>
<i>5.2.2. Diseño de microemulsiones múltiples o/a/o</i>	<i>206</i>
<i>5.3. Microemulsiones múltiples o/a/o constituidas por microemulsión primaria (o/a)/Brij® 96, PEG 400 y IPM</i>	<i>208</i>
<i>5.3.1 Componentes de las microemulsiones múltiples o/a/o</i>	<i>208</i>
<i>5.3.2. Diseño de las microemulsiones múltiples o/a/o</i>	<i>209</i>
<i>5.3.3. Reología de las microemulsiones múltiples o/a/o</i>	<i>212</i>
<i>5.3.3.1. Influencia de la relación Brij® 96/PEG 400 sobre el comportamiento reológico de las microemulsiones múltiples o/a/o</i>	<i>212</i>
<i>5.3.3.2. Influencia del contenido total Brij® 96/PEG 400 sobre el comportamiento reológico de las microemulsiones múltiples o/a/o</i>	<i>214</i>
<i>5.3.3.3. Influencia del contenido en fase interna sobre el comportamiento reológico de las microemulsiones múltiples o/a/o</i>	<i>215</i>
<i>5.3.4. Estudio del tamaño de gotícula de la fase interna de las microemulsiones múltiples o/a/o</i>	<i>217</i>
<i>5.3.4.1. Influencia de la relación Brij® 96/PEG 400 sobre el tamaño de gotícula de las microemulsiones múltiples o/a/o</i>	<i>217</i>
<i>5.3.4.2. Influencia del contenido total Brij® 96/propilenglicol sobre el tamaño de gotícula de las microemulsiones múltiples o/a/o</i>	<i>218</i>
<i>5.3.4.3. Influencia del contenido en fase interna sobre el tamaño de gotícula de las microemulsiones múltiples o/a/o</i>	<i>219</i>

5.3.5. Incorporación de nifedipino en las microemulsiones múltiples o/a/o	220
5.3.5.1. Incremento de la cantidad incorporada de nifedipino en la fase interna de la microemulsión múltiple o/a/o	221
5.3.5.2. Caracterización de la microemulsión primaria o/a constituida por IPM/DMA (4:1), Brij® 96, propilenglicol y agua	222
5.3.5.3. Incorporación de nifedipino en la fase externa (IPM) de la microemulsión múltiple o/a/o	225
5.3.6. Caracterización de las microemulsiones múltiples o/a/o constituidas por microemulsión primaria (o/a)/Brij®96/PEG 400/IPM (20/30/50; p/p/p) con nifedipino incorporado en la fase interna y externa	226
5.3.6.1. Aspecto y color	226
5.3.6.2. Reología y viscosidad de las microemulsiones múltiples o/a/o	226
5.3.6.3. Tamaño de gotícula de las microemulsiones múltiples o/a/o	227
5.3.6.4. Determinación del pH en las microemulsiones múltiples o/a/o	229
5.3.7. Estabilidad de las microemulsiones múltiples o/a/o frente a la temperatura y la humedad	232
5.3.8. Estabilidad de las microemulsiones múltiples de nifedipino a los ciclos de congelación y descongelación	234
5.3.9. Estabilidad de las microemulsiones múltiples de nifedipino en el test de centrifugación	234
5.4. Microemulsiones múltiples o/a/o constituidas por, microemulsión primaria o/a, Brij® 96, propilenglicol y IPM	235
5.4.1. Componentes de las microemulsiones múltiples o/a/o	235
5.4.2. Diseño de microemulsiones múltiples o/a/o	235
5.4.3. Reología de las microemulsiones múltiples o/a/o	238
5.4.3.1. Influencia de la relación Brij® 96/PG sobre el comportamiento reológico de las microemulsiones múltiples o/a/o	238
5.4.3.2. Influencia del contenido total Brij® 96/propilenglicol sobre el comportamiento reológico de las microemulsiones múltiples o/a/o	240
5.4.3.3. Influencia del contenido en fase interna sobre el comportamiento reológico de las microemulsiones múltiples o/a/o	241
5.4.4. Estudio del tamaño de gotícula de la fase interna de las microemulsiones múltiples o/a/o	243
5.4.4.1. Influencia de la relación Brij®96/PG sobre el tamaño de gotícula de las microemulsiones múltiples o/a/o	243

5.4.4.2 Influencia del contenido total en Brij® 96/propilenglicol sobre el tamaño de gotícula de las microemulsiones múltiples o/a/o	244
5.4.4.3. Influencia del contenido en fase interna en el tamaño de gotícula de las microemulsiones múltiples o/a/o	245
5.4.5. Incorporación de nifedipino en la microemulsión múltiple o/a/o	246
5.4.5.1. Incremento de la cantidad incorporada de nifedipino en la fase interna de la microemulsión múltiple o/a/o	246
5.4.5.2. Caracterización de la microemulsión primaria o/a constituida por IPM/DMA (4:1), Brij® 96, propilenglicol y agua	247
5.4.5.3. Incorporación de nifedipino en la fase externa (IPM) de la microemulsión múltiple	247
5.4.6. Caracterización de las microemulsiones múltiples constituidas por microemulsión primaria (o/a)/Brij® 96/PG/IPM (20/30/50; p/p/p)	247
5.4.6.1. Aspecto y color	247
5.4.6.2. Reología y viscosidad de las microemulsiones múltiples o/a/o	248
5.4.6.3. Tamaño de gotícula de las microemulsiones múltiples o/a/o	249
5.4.6.4. Determinación del pH en las microemulsiones múltiples o/a/o	250
5.4.7. Estabilidad de las microemulsiones múltiples o/a/o frente a la temperatura y la humedad	251
5.4.8. Estabilidad de las microemulsiones múltiples o/a/o a los ciclos de congelación y descongelación	254
5.4.9. Estabilidad de las microemulsiones múltiples o/a/o de nifedipino en el test de centrifugación	255
CAPITULO VI. ESTUDIOS DE ABSORCIÓN TRANSDÉRMICA DE NIFEDIPINO	259
6.1. Estudios de cesión in vitro de nifedipino a través de la membrana artificial de PVDF desde microemulsiones múltiples o/a/o constituidas por microemulsión primaria o/a, Brij® 96, PEG 400 y IPM	259
6.1.1. Preparación de las microemulsiones	260
6.1.2. Determinación de los coeficientes de reparto	262
6.1.3. Estudios de cesión in vitro	265
6.1.4. Estudios comparativos de cesión in vitro de nifedipino desde sistemas dispersos o/a/o, o/a y a/o constituidos por Brij® 96/PEG 400 como tensioactivo/cotensioactivo	287
6.2. Estudios de cesión in vitro de nifedipino desde microemulsiones múltiples o/a/o constituidas por microemulsión primaria o/a, Brij® 96, propilenglicol	

y IPM a través de la membrana artificial de PVDF	291
6.2.1. <i>Preparación de las microemulsiones</i>	292
6.2.2. <i>Determinación de los coeficientes de partición</i>	293
6.2.3. <i>Estudios de cesión in vitro</i>	296
6.2.4. <i>Estudios comparativos de cesión in vitro de nifedipino desde sistemas dispersos o/a/o, o/a y a/o constituidos por Brij® 96/PG como tensioactivo/cotensioactivo</i>	317
6.3. Estudios de cesión in vitro de nifedipino a través de piel de rata desde microemulsiones múltiples o/a/o constituidas por microemulsión primaria o/a, Brij® 96, PEG 400 y IPM	321
6.3.1. <i>Preparación de las microemulsiones</i>	322
6.3.2. <i>Estudios de cesión in vitro</i>	322
6.4. Estudios de cesión in vitro de nifedipino a través de piel de rata desde microemulsiones múltiples o/a/o constituidas por microemulsión primaria o/a, Brij® 96, PEG 400 y IPM	330
6.4.1. <i>Preparación de las microemulsiones</i>	331
6.4.2. <i>Estudios de cesión in vitro</i>	331
CONCLUSIONES	343
BIBLIOGRAFÍA	349

OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO

PARTE TEÓRICA

CAPÍTULO I. NIFEDIPINO

I.- NIFEDIPINO

1.1.- Descripción

El nifedipino, un derivado de 1,4-dihidropiridina de segunda generación, es un antagonista de calcio que bloquea la entrada de iones calcio (Ca^{2+}) hacia el interior de la célula dando lugar, principalmente, a efectos vasodilatadores periféricos y coronarios (Fisher y cols., 1983). El nifedipino, junto con otros antagonistas del calcio, se ha utilizado frecuentemente con el fin de estudiar los mecanismos reguladores calcio-dependientes.

1.2.- Estructura

El nifedipino presenta la siguiente estructura química:

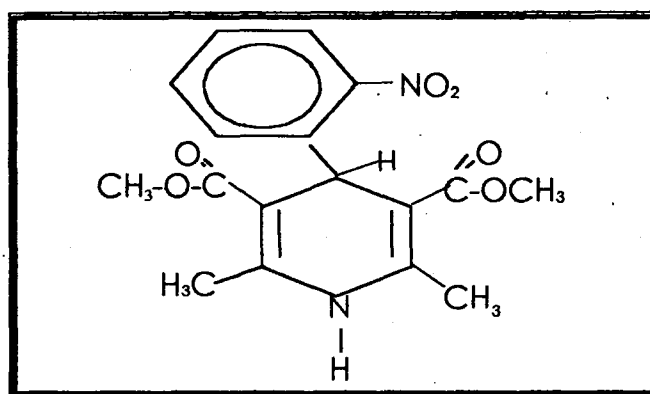


Figura 1. Fórmula estructural del nifedipino.

La relación estructura-actividad que se ha observado en los fármacos que actúan bloqueando los canales de calcio, han permitido una mejor comprensión de su interacción con dicho canal. En particular, se han estudiado con detalle los requerimientos estructurales que conducen a una actividad óptima en las 1,4-dihidropiridinas, como es el caso del nifedipino. Así, se ha observado que el anillo 1,4-dihidropiridina al igual que el hidrógeno situado sobre el átomo de nitrógeno son esenciales para su actividad.

La sustitución de los agrupamientos éster por sustituyentes aceptores de electrones provoca una disminución en su actividad. El grupo nitro se asocia con una actividad activante y se ha sugerido que las diferencias entre los puentes de hidrogeno, que se establecen con participación de los grupos éster y nitro, son los que inducen a una conformación preferentemente cerrada (bloqueante) o abierta (activante) (Pedregal y cols., 1993).

1.3.- Propiedades físico-químicas

El nifedipino es un polvo cristalino de color amarillo con un punto de fusión entre 171 y 175 °C. Es prácticamente insoluble en agua, ligeramente soluble en alcohol

absoluto, metanol y muy soluble en acetona, cloroformo y etil acetato (Syed Laik Ali, 1989). El nifedipino es fotosensible y en función de su irradiación por la luz del día o luz ultravioleta, a determinadas longitudes de onda, se origina un derivado de nitrofenilpiridina o un derivado de nitrosfenilpiridina, respectivamente (Greenhill, 1995) (Figura 2). Sus soluciones se deben preparar protegidas de la luz o a longitudes de onda mayores de 420 nm, inmediatamente antes de su uso. Se debe almacenar protegido de la luz y en recipientes herméticamente cerrados (Martindale, 1996).

1.4.- Acción farmacológica del nifedipino

1.4.1.- Mecanismo de acción

En condiciones de reposo, la concentración de calcio extracelular es unas 10.000 veces mayor que la concentración de calcio intracelular y el potencial intracelular es electronegativo, lo que conduce a un gradiente electronegativo que facilita la entrada de calcio a través de la membrana. En condiciones de reposo, este fenómeno no ocurre ya que la membrana es poco permeable al calcio. Sin embargo, cuando la membrana se estimula, bien por despolarización o por acción de un agonista, tiene lugar la entrada de calcio a través de canales específicos para este catión.

En el miocardio, la entrada de calcio tiene lugar a través de unos canales específicos de cinética más lenta que la de los canales rápidos de entrada de sodio. Estos canales son los canales lentos, cuya apertura activa una corriente lenta de entrada de calcio. Por el contrario, a nivel de la fibra muscular lisa sabemos que existen dos tipos de canales: a) voltaje-dependientes, que se activan y permiten la entrada de calcio a su través cuando la membrana se despolariza, y b) receptor-dependientes, que se activan cuando un agonista (noradrenalina, 5-HT, TXA₂) se une a un receptor específico localizado en la superficie externa de la membrana celular. Los antagonistas de los canales de calcio, entre los que se encuentra el nifedipino, inhiben la entrada de calcio a través de ambos canales, si bien son más efectivos para bloquear los canales voltaje-dependientes que los receptor-dependientes.

Los canales voltaje-dependientes contienen dominios de secuencia homóloga que están dispuestos en tándem dentro de una única subunidad grande. Los canales de calcio están constituidos por una subunidad principal denominada α_1 y otras subunidades relacionadas denominadas (α_2 , β , γ , y δ) (Schwartz, 1992).

En función de la conductancia y sensibilidad al voltaje, los canales de calcio voltaje-dependientes se han dividido en al menos tres subtipos (Schwartz, 1992; Tsien y cols., 1988). Entre los canales mejores caracterizados se encuentran los subtipos L, N, y T. De estos canales, únicamente el tipo L es sensible al bloqueo de los calcio-antagonistas tipo dihidropiridina, como es el caso del nifedipino (Vaghy, 1998).

Los antagonistas del calcio no inhiben la difusión pasiva de calcio a favor de su gradiente electroquímico, ni el intercambio sodio-calcio. Esto constituye una ventaja ya que pequeñas cantidades de calcio pueden atravesar el sarcolema y ejercer sus funciones celulares.

Los canales de calcio son estructuras complejas que poseen filtros de selectividad, que permiten la entrada de calcio con prioridad sobre otros iones. Además posee dos compuertas, una de activación y otra de inactivación, que pueden modificar su posición (abierta/cerrada) al modificarse el potencial de membrana gracias a sensores de voltaje (Figura 2). Ello permite que el canal de calcio presente tres posibles formas: reposo, activado (abierto) e inactivado. Una vez que el canal es inactivado, este debe de volver a la posición de reposo antes de volver a activarse, y a este proceso se le denomina reactivación del canal de calcio.

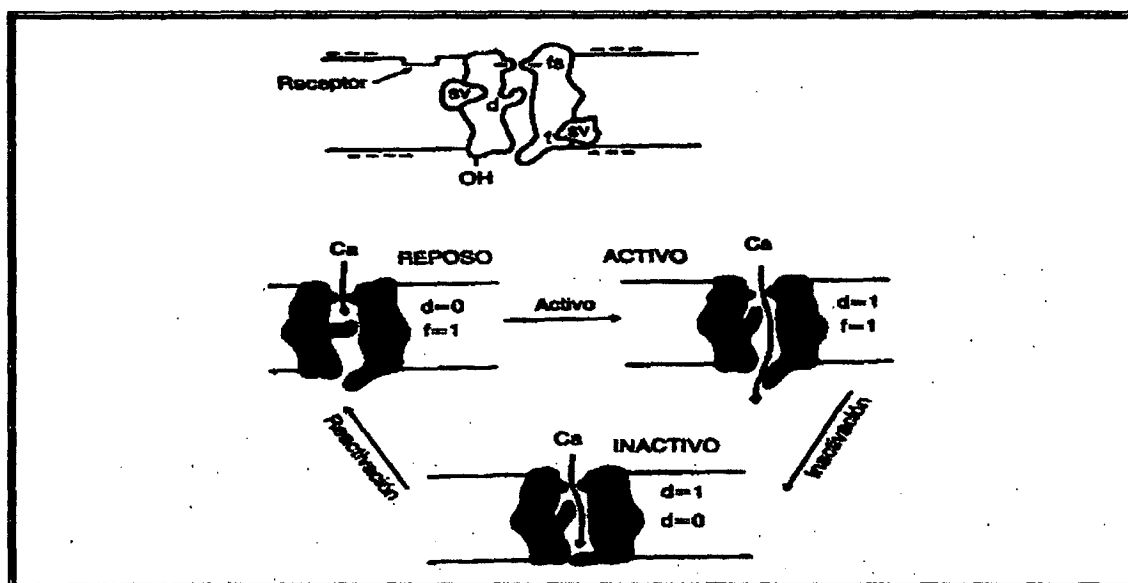


Figura 2. Representación esquemática del canal de calcio. En la parte superior se observa que consta de sensores de voltaje (SV), filtros de selectividad (FS) y de dos compuertas, una de activación (d) y otra de inactivación (f). Según las compuertas se encuentren abiertas (1) o cerradas (0), el canal de calcio adopta tres posiciones: reposo, activo e inactivo. Obsérvese que tras la inactivación, el canal debe volver al estado de reposo (reactivación) antes de poder ser activado de nuevo.

La utilización de radioligandos (^3H nitrendipina y ^3H nifedipino) ha demostrado la existencia de tres puntos de unión; uno para las dihidropiridinas, otro para las difenilalquilaminas y otro para el diltiazem. Existe una interacción alostérica entre estos fármacos, de tal forma que el verapamil dificulta, mientras que el diltiazem facilita la fijación de las dihidropiridinas a su punto de unión. Aunque no se conocen los puntos de unión, sabemos que forman parte del canal de calcio, y que la unión de los antagonistas de calcio a dichos puntos disminuye el número de canales que se activan, lo que conduce a una reducción en la entrada de calcio a través de los canales del sarcolema. El punto de unión para las dihidropiridinas se encuentra en la superficie externa del canal, mientras que para el verapamil y el diltiazem se encuentra localizado en la superficie citosólica o interna del sarcolema.

Existen también diferencias entre los antagonistas de calcio en cuanto al tipo de bloqueo que producen. Así, la dihidropiridinas se unen y bloquean el canal del calcio en cualquiera de sus formas (abierto, cerrado y reposo), pero no modifican la cinética de apertura y cierre de las compuertas. El verapamil y diltiazem se unen al canal de calcio inhibiendo la entrada de calcio a su través sólo cuando este se encuentra abierto o inactivado, pero no cuando está en reposo, y además hacen más lenta la reactivación del canal de calcio. La inhibición de la entrada de calcio que estos fármacos producen

aumenta con la frecuencia de la estimulación, por lo que sus efectos depresores sobre la función sinusal y la conducción auriculo-ventricular son más marcados a frecuencias rápidas que a frecuencias lentas. Estas diferencias explican porque el verapamil y diltiazem, pero no las dihidropiridinas, poseen propiedades antiarrítmicas. El nifedipino como consecuencia del bloqueo de los canales de calcio ejerce su principal efecto a nivel de la musculatura vascular lisa produciendo vasodilatación, y se utiliza principalmente en el tratamiento de la hipertensión y la angina de pecho (Fisher y cols., 1983).

1.4.2.- Propiedades farmacodinámicas

1.4.2.1.- Efectos en las células cardiacas

El nifedipino inhibe la corriente lenta de entrada del Ca^{2+} en tejidos cardiacos, actuando principalmente a nivel de los nodos sinoauricular y auriculoventricular (Singh y cols., 1982, 1983, 1984). Además, reduce la función nodal auriculoventricular, los periodos refractarios efectivos y el ciclo largo auriculoventricular nodal de Wenckebach. Debido a estos efectos, se emplea como tratamiento de elección en sustitución a otros antagonistas de Ca^{2+} (verapamil y diltiazem) en pacientes con isquemia cardiaca sintomática y con depresión del nodo auriculoventricular (Furlanetto y cols., 1980; Betxon y cols., 1983). También se ha observado que reduce significativamente la depresión del segmento ST, que se origina durante el proceso de disminución de isquemia en el tejido miocárdico después de la práctica del ejercicio físico (Majid y De Jong., 1982).

1.4.2.2.- Efectos hemodinámicos

Se ha demostrado clínicamente que el nifedipino, junto con los demás antagonistas de los canales de Ca^{2+} , disminuye la resistencia vascular coronaria y aumenta el flujo sanguíneo coronario. Los efectos hemodinámicos del nifedipino varían dependiendo de la vía de administración y de la magnitud en la disfunción del ventrículo izquierdo.

El nifedipino, por vía intravenosa, aumenta el flujo sanguíneo hasta el antebrazo presentando poco efecto sobre el estancamiento venoso; esto indica una dilatación selectiva de los vasos de resistencia arterial. El descenso de la presión arterial desencadena reflejos simpáticos que dan lugar a taquicardia e inotropismo positivo. También, origina efectos inotrópicos negativos directos in vitro. No obstante, el nifedipino relaja el músculo liso vascular a concentraciones mucho menores que las requeridas para obtener efectos significativos sobre el corazón. De este modo, disminuye la resistencia arteriolar y la presión arterial, mejora la contractilidad y la función ventricular segmentaria, y se observa un incremento moderado de la frecuencia y el gasto cardiaco (Bourassa, 1980; Serruys y cols., 1981; Theroux y cols., 1985). Después de su administración por vía oral, la dilatación arterial incrementa el flujo sanguíneo periférico mientras que el tono venoso se mantiene inalterado. La administración intracoronaria del nifedipino provoca un deterioro de la relajación

ventricular diastólica (Walsh y O'Rourke, 1985), aunque varios estudios clínicos han sugerido una mejora del índice de llenado máximo del ventrículo izquierdo (Pauls y cols., 1983).

1.4.3.- Biofarmacia y farmacocinética

- Absorción: tras la administración de una dosis por vía oral, aproximadamente el 100 % del nifedipino se absorbe a nivel del intestino delgado (Raemsch y Sommer, 1983). Sin embargo, únicamente un 45-68% del fármaco alcanza la circulación sistémica. Existen variaciones considerables en las concentraciones máximas plasmáticas de nifedipino y en el tiempo necesario para alcanzar las mismas. Estas variaciones se pueden deber a la gran variabilidad interindividual existente en el proceso de absorción y en el efecto de primer paso metabólico que sufre el fármaco en el hígado (Foster y cols., 1983; Stern y cols., 1984).

Diferentes autores han estudiado las diferencias originadas en las concentraciones plasmáticas de nifedipino en función de la vía de administración y la forma farmacéutica. Estos estudios han demostrado que la absorción de nifedipino desde comprimidos se retrasa (t_{\max} 1,6 a 4,2 horas) en comparación con su absorción desde cápsulas (t_{\max} 0,5 a 2,17 horas), aunque la biodisponibilidad en ambos casos es similar (52%) (Foster y cols., 1983; Kleinbloesem y cols., 1984a). También, se ha observado una gran variabilidad interindividual tanto en la administración oral como sublingual de nifedipino como consecuencia de la existencia de individuos rápidos y lentos a la hora de absorber y metabolizar el fármaco (Nakashima y cols., 1984; Snedden y cols., 1984b). Se ha demostrado la existencia de una absorción rápida y completa de nifedipino después de su administración por vía rectal desde supositorios (Kleinbloesem y cols., 1984c). Por último, estudios farmacocinéticos después de una administración intravenosa han revelado que 1 mg de nifedipino propicia la aparición de concentraciones plasmáticas de 19 a 41 $\mu\text{g/L}$ alcanzándose la máxima concentración plasmática a los 5 minutos (Foster y cols., 1983; McAlister, 1983).

- Distribución: en seres humanos, el volumen de distribución del nifedipino tras su administración por vía oral es de 1,32 l/kg. (Foster y cols., 1983). Por vía intravenosa, presenta valores de distribución comprendidos entre 0,62 y 1,12 l/kg (Kleinbloesem y cols., 1984b; Raemsch y Sommer, 1983).

El nifedipino circulante se une en elevado porcentaje a proteínas plasmáticas (92-98%). Su unión a la albúmina es dependiente de la concentración de nifedipino en el organismo. Esta intensa unión a la albúmina parece ser que contribuye a la larga duración de efectos del fármaco (Schlossman y cols., 1975).

- Metabolismo: diferentes estudios han mostrado que en el metabolismo del nifedipino esta involucrado el citocromo P-450 monooxigenasa como sistema enzimático hepático (Hamann y cols., 1985). Aproximadamente, el 95% del nifedipino sufre oxidación a nivel hepático dando lugar a 3 metabolitos farmacológicamente inactivos que son excretados en orina (Kroneberg y Krebs, 1980) (Figura 3). Los derivados hidroxi y metoxi ácido carboxílicos se han detectado principalmente en orina (Kondo y

cols., 1980). Después de la administración oral de nifedipino se ha podido comprobar que el derivado hidroxilo se encuentra en mayor concentración en el plasma que el metoxi (Raemsch y Sommer, 1983). Sin embargo, el análogo de nitropiridina presenta una mayor concentración a nivel plasmático tras de la administración oral de nifedipino. Este análogo se considera el principal metabolito que resulta del efecto de primer paso que sufre el nifedipino en el organismo (Waller y cols., 1984b).

Después de la absorción entérica del nifedipino en el organismo, aproximadamente un 30-40% del mismo se elimina metabólicamente debido al efecto de primer paso, por lo que no alcanza la circulación sistémica.

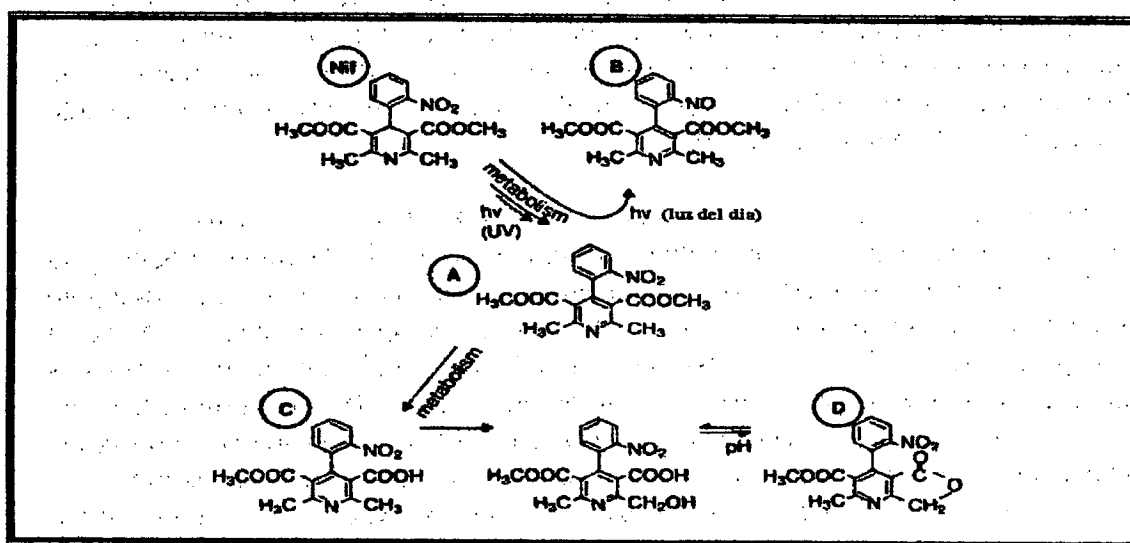


Figura 3. Biotransformación del nifedipino (Nif). Metabolito de piridina procedente de la oxidación del nifedipino (A). Formación de un derivado ácido hidroxilo carboxílico durante el proceso de biotransformación debido a un fenómeno de hidrólisis (B). Derivado ácido metoxi carboxílico (C) debido a una posterior oxidación del metabolito (B).

- **Semivida de eliminación:** según los estudios realizados, la semivida de eliminación del nifedipino depende de la forma farmacéutica empleada para su administración. La semivida de eliminación tras la administración oral de comprimidos y cápsulas es de 6-11 horas y 2-3,4 horas, respectivamente (Ochs y cols., 1984; Taburet y cols., 1983) y de 1,3-1,8 horas tras la administración intravenosa (Foster y cols., 1983).

- **Eliminación:** según algunos autores los valores de aclaramiento total sistémico (intravenoso) y aclaramiento intrínseco (oral) de nifedipino podrían presentar valores de 27-66 l/h (Foster y cols., 1983; Kleinbloesem y cols., 1984a) y 33-37 l/h (Benzet y cols., 1983; Ochs y cols., 1984), respectivamente.

- **Efecto de la alteración renal sobre la farmacocinética:** la farmacocinética del nifedipino no se ve afectada significativamente en pacientes con alteración renal severa (Bogaert y cols., 1984), ni tampoco durante la hemodiálisis (Spital y Scandling, 1983). La falta de un efecto significativo de la diálisis en la curva concentración plasmática-tiempo del nifedipino puede ser debida, en parte, a su alto grado de unión a proteínas plasmáticas y a su elevada lipofilia (Bogaert y cols., 1984).

- Relación entre concentraciones plasmáticas y efectos clínicos: algunos estudios han demostrado que las concentraciones plasmáticas de nifedipino presentan una correlación significativa con cambios en la presión sanguínea, ritmo cardíaco y disminución de la presión en el esfínter esofágico (Hirasawa y cols., 1985; Theroux y cols., 1985). Además, se ha observado que la mejora en la tolerancia al ejercicio físico y la disminución de la frecuencia e incidencia de ataques isquémicos en pacientes con angina de pecho, están relacionadas directamente con las concentraciones plasmáticas del fármaco (Chaitman y cols., 1984; Stern y cols., 1984).

1.4.4.- Efectos adversos

Aproximadamente en un 20% de los pacientes que reciben nifedipino se han descrito la aparición de efectos adversos relacionados con la dosis (Lewis, 1983). La mayoría de los efectos adversos están relacionados con las propiedades vasodilatadoras del nifedipino, entre los que se incluyen dolor de cabeza (7%), enrojecimiento facial y de la piel (5 al 7%), vértigo (3 al 12%), síntomas gastrointestinales (náuseas, vómitos, dispepsia), retención de fluidos (5,2 al 7,5%) y edema de piernas (0,6 al 7,7 %) (Terry, 1982). El carácter, la incidencia y la severidad de los efectos adversos son independientes de la duración del tratamiento.

Los efectos secundarios se pueden mitigar reduciendo la dosis de nifedipino que se administra (Covinsky y Hamburger, 1983) o por combinación del fármaco con agentes β -bloqueantes. Debido a que esta combinación presenta el mismo riesgo para el paciente que el tratamiento único con nifedipino, la administración concomitante podría representar una ventaja en el tratamiento de la angina de pecho o hipertensión en pacientes con problemas cardiovasculares. La interrupción del tratamiento como consecuencia de la aparición de efectos adversos sólo es necesaria aproximadamente en un 4% de los pacientes.

1.5.- Terapia y administración

La dosis de nifedipino se debe individualizar en el tratamiento de pacientes con angina de pecho, hipertensión o fenómeno de Raynaud. En el inicio del tratamiento, la dosis recomendada es de 10 mg por cápsula tres veces al día, durante o después de las comidas, y puede ser modificada hasta alcanzar 20 mg tres veces al día en pacientes con hipertensión o fenómeno de Raynaud. En casos necesarios, en pacientes con angina, la dosis puede aumentarse de 30 mg en 30 mg, hasta un máximo de 120 mg por día. Si lo que se pretende es obtener un efecto inmediato, las cápsulas se muerden y el líquido se retiene en la boca para conseguir mayor absorción a nivel sublingual.

Existen comprimidos de liberación sostenida comercializados para el tratamiento de la hipertensión. La dosis recomendada es de 20 mg dos veces al día, después de las comidas, pudiéndose incrementar hasta 40 mg dos veces al día.

Recientemente, se han desarrollado preparaciones inyectables (inyección intravenosa o infusión) para el tratamiento de vasoespasmos coronarios y en episodios

de hipertensión aguda. Se encuentra disponible una formulación para la administración intracoronaria de nifedipino en el tratamiento de vasoespasmos coronarios que ocurren durante el diagnóstico o en intervenciones terapéuticas (Martindale, 1996).

1.6.- Otros usos terapéuticos

El nifedipino de forma menos frecuente, debido a sus efectos farmacodinámicos, se emplea en el tratamiento de distintas patologías:

- Aterogénesis coronaria: retarda el desarrollo de lesiones ateroscleróticas en la circulación coronaria, ya que disminuye el tiempo de trombolisis e inhibe la agregación plaquetaria (Hiroki y cols., 1982).

- Alteraciones del riñón: disminuye la constricción arteriolar aferente, con muy poco o sin efecto sobre el tono arteriolar eferente. Debido a este efecto, el nifedipino incrementa la perfusión renal y la filtración glomerular en pacientes con hipertensión esencial (Carmines y cols., 1992).

- Migraña: reduce la frecuencia y la severidad de la migraña asociada con el síndrome de Raynaud y en pacientes con lupus eritematosus (Miller y Santoro, 1984).

- Patologías esofágicas: se ha utilizado en el tratamiento de patologías de la motilidad esofágica debido a su capacidad de relajar la musculatura lisa (Bartolotti y Labo, 1981).

- Hipertensión pulmonar: se han realizado numerosos estudios para comprobar la posible eficacia del nifedipino en el tratamiento de la hipertensión pulmonar (McLeod y Jewitt, 1986). Pero únicamente, los resultados aportados por Rich y cols. (1992) han demostrado que dosis altas de nifedipino pueden mejorar la supervivencia de pacientes con hipertensión pulmonar.

- Patologías del tracto urinario: la terapia de nifedipino en pacientes con incontinencia urinaria severa ha resultado ser eficaz por su capacidad de inhibir el efecto sobre las contracciones detrusoras (Rud y cols., 1979).

1.7.- Precauciones

El nifedipino se debe utilizar con precaución en pacientes con hipotensión, en pacientes con pobre reserva cardíaca y en los que presentan insuficiencia cardíaca. No se debe utilizar en casos de shock cardiogénico. En pacientes con estenosis aórtica severa puede incrementar el riesgo de producirse insuficiencia cardíaca. La supresión repentina del tratamiento podría estar asociada a una exacerbación de la angina de pecho. La dosis debe ser reducida en pacientes con disfunción renal.

El nifedipino puede aumentar el efecto antihipertensivo de otros agentes antihipertensivos tales como los β -bloqueantes, aunque esta combinación generalmente

es bien tolerada por el paciente. La administración de nifedipino en pacientes diabéticos podría provocar el ajuste de su tratamiento antidiabético.

El tratamiento con nifedipino debe suprimirse inmediatamente en aquellos pacientes que experimentan dolor isquémico.

Se ha demostrado, que el nifedipino es teratogénico en animales y además puede inhibir el parto, por lo que no se recomienda su tratamiento durante el embarazo (Martindale, 1996).

1.8.- Interacciones

La mayoría de los estudios han demostrado que el nifedipino no presenta efecto sobre las concentraciones plasmáticas de digoxina (Kuhlmann, 1985; Hansen y cols., 1984). Sin embargo, otros estudios han confirmado que el nifedipino incrementa las concentraciones y los efectos clínicos de la digoxina (Belz y cols., 1983; Auricchio, 1983).

El nifedipino tampoco influye sobre las farmacocinéticas de metoprolol, atenolol, nadolol o propanolol (Gangji y cols., 1984). No obstante, se han publicado algunos casos de hipotensión severa y fallos cardíacos durante la administración concomitante de nifedipino y β -bloqueantes en pacientes con angina de pecho severa, disfunción del ventrículo izquierdo y antecedentes de infartos de miocardio (Opie y White, 1980).

La administración de nifedipino disminuye las concentraciones plasmáticas de quinidina y aumenta las de teofilina y fenitoina (Ahmaad, 1984b, Parrillo y Venditto, 1984). El nifedipino posee la capacidad de potenciar los efectos de ciertos fármacos como la terbutalina y salbutamol (Lever y cols., 1984; Löfdahl y cols., 1984).

La ranitidina y la cimetidina incrementan significativamente la biodisponibilidad del nifedipino, pudiendo la cimetidina, además, aumentar los efectos hipotensivos del nifedipino en pacientes sanos (Kirch y cols., 1985).

1. $\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_3\text{O}^+ + \text{OH}^-$

2. $\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$ (no net reaction)

3. $\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$ (no net reaction)

4. $\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$ (no net reaction)

5. $\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$ (no net reaction)

6. $\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$

7. $\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$ (no net reaction)

8. $\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$ (no net reaction)

9. $\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$ (no net reaction)

10. $\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$ (no net reaction)

CAPÍTULO II. ABSORCIÓN TRANSDÉRMICA DE FÁRMACOS

II.- ABSORCIÓN TRANSDÉRMICA DE FÁRMACOS

2.1.- Introducción

La utilización de la piel como vía de administración de fármacos no es de reciente innovación (Scheuplein y Blank, 1971). En las dos últimas décadas se han producido grandes avances en el desarrollo de los sistemas de liberación transdérmica de fármacos (absorción percutánea). La utilización de esta vía promete una serie de ventajas en terapéutica con respecto a la administración oral y parenteral (Chien y cols., 1989; Seki y cols., 1991):

<i>Ventajas</i>	<i>Inconvenientes</i>
Evita el efecto de primer paso hepático	Metabolismo a nivel superficial de la piel
Evita la degradación gastrointestinal	Variabilidad inter e intraindividual
Menor incidencia de efectos adversos	Absorción dependiente de las propiedades físico-químicas de la molécula (peso molecular, punto de fusión, y coeficiente de reparto).
Mantenimiento de los niveles plasmáticos terapéuticos	Restricción del número de fármacos con posibilidad de atravesar la piel.
Facilidad para la administración del fármaco	Influencia de los procesos patológicos de la piel
Aporta una extensa superficie para la difusión del fármaco	Dificultad en la obtención de una absorción similar en velocidad y magnitud a la vía intravenosa o nasal
Cumplimiento posológico por parte del paciente	
Bajo la superficie de la piel posee una extensa red vascular.	

Tabla I. Ventajas e inconvenientes de la administración percutánea de fármacos.

Se pueden definir como sistemas transdérmicos de liberación de fármacos, a todas aquellos sistemas que son aplicados sobre la superficie del cuerpo y son diseñados para liberar el principio activo a través de la piel, distribuyéndose finalmente a una zona determinada del organismo lejos de su lugar de aplicación, donde va ejercer su acción.

El uso de la piel como vía para la administración de fármacos, con el objetivo de conseguir efectos a nivel sistémico, se comenzó a explotar comercialmente y científicamente hace aproximadamente 40 años. Desde entonces, se han formulado numerosos principios activos en preparaciones semisólidas para su absorción percutánea (nitroglicerina, ketoprofeno, ibuprofeno, estradiol y testosterona). Este tipo de preparaciones presenta muy poca reproducibilidad en las concentraciones plasmáticas alcanzadas y en la duración de efectos terapéuticos. Estas formulaciones se encuentran influenciadas por diversos factores, tales como la frecuencia de administración, la cantidad administrada y el área de aplicación.

A partir del trabajo realizado por Scheuplein y Blank (1971), se intensificaron las investigaciones encaminadas a estudiar de manera más detallada la permeabilidad de la piel. El resultado final fue el desarrollo de sistemas transdérmicos modernos de liberación controlada de fármacos. Estos sistemas se caracterizan por permitir una cómoda aplicación capacidad para mantenerse en el lugar de administración durante períodos prolongados y fácil eliminación durante o después del tratamiento. Además, permite reducir la frecuencia de administración y mantener unos niveles plasmáticos constantes, reduciéndose considerablemente los efectos adversos que se observan cuando se administran estos principios activos por vía oral. La propiedad intrínseca de defensa que presenta la piel frente a los agentes exógenos constituye la principal limitación en la absorción percutánea de fármacos.

Son muy pocos los principios activos que se pueden formular en sistemas transdérmicos de liberación tipo "parche" (escopolamina, nitroglicerina, clonidina, estradiol, fentanilo, testosterona y nicotina. Como alternativa a los sistemas anteriormente mencionados existen formulaciones novedosas para la administración transdérmica de fármacos como son las nanopartículas, liposomas o microemulsiones (Knepp y cols.; 1990; Cappel y Kreuter, 1991; Iwamoto y cols.; 1991; Thacharodi y cols; 1994).

Se han desarrollado distintas técnicas con el fin de mejorar la absorción de aquellos fármacos que no presentan capacidad intrínseca de atravesar la piel: 1) empleo de profármacos que son metabolizados a la forma activa tras atravesar la piel, permitiendo aumentar la absorción del fármaco (Fort y cols., 1993), 2) utilización de métodos físicos como la iontoforesis (Sage, 1993), sonoforesis (Mitragotri y cols., 1995) y ultrasonidos (Tyle y cols., 1989), 3) empleo de exaltadores de la permeabilidad (Williams y Barry, 1990) que modifican químicamente la piel reduciendo la resistencia a la difusión de los fármacos administrados. El desarrollo de estos métodos junto con la rápida evolución de la tecnología permitirán en un futuro inmediato, incrementar el número de compuestos con baja capacidad de absorción (proteínas, péptidos y nucleótidos).

Por último, es importante tener en cuenta a la hora de desarrollar este tipo de sistemas la respuesta alérgica o irritante que pueden producir tanto el principio activo como cualquier otro componente de la formulación.

2.2.- Anatomía y composición bioquímica de la piel

2.2.1.- Estructura

La piel es uno de los órganos del cuerpo humano con mayor extensión y accesibilidad. La piel de una persona adulta cubre aproximadamente una superficie de 2 m² y recibe un tercio de la sangre que circula por el cuerpo. Es elástica, y presentan distintas características según la región. Con un espesor de unos pocos milímetros (2,97±0,28 mm), la piel separa el entramado circulatorio y los órganos del medio externo. Además, actúa como barrera ante los ataques físicos y químicos, y protege al cuerpo de la invasión de los microorganismos (Ritschel y Hussain, 1988).

El estudio microscópico de la piel ha permitido concluir que es un órgano multiestratificado constituido por numerosas barreras histológicas. Generalmente, se describe como un órgano formado por tres capas de tejido: epidermis, dermis y tejido subcutáneo, como puede apreciarse en la siguiente figura:


ANATOMÍA	ESPESOR (μm)		FUNCIÓN
 <p> Pelo Poro sudoríparo Estrato córneo Estrato germinativo Red capilar Glándula sebacea Canal eccino sudoríparo Músculo erector Folículo piloso Glándula sudorípara eccina Pupila dermal Vaso sanguíneo Célula grasa </p>	Epidermis	100-200	Barrera, elasticidad, regeneración, formación de melanina
	Dermis	800-400	Soporte, fuerza mecánica, regulación de la temperatura
	Hipodermis	Ausente o varios mm	Aislamiento mecánico contra estrés físico y aislamiento térmico

Figura 4. Anatomía y función de la piel humana.

- **Epidermis:** es la capa más externa de la piel y está constituida por células epiteliales que son escamosas y estratificadas. Estas células epiteliales se encuentran unidas unas a otras por puentes que se enlazan con una extremada complejidad y que son los responsables de mantener la integridad de la piel. En función de la región del cuerpo el grosor de la epidermis varía siendo menor en las palmas de las manos y la planta de los pies y mayor grosor en la parte ventral del tronco (Idson, 1975).

Secciones microscópicas de la piel, nos muestran que esta formada por dos partes: *estrato córneo* y *estrato germinativo*. El *estrato córneo* representa la parte más externa de la epidermis y está constituido por numerosas capas de células queratinizadas, compactadas, aplanadas y deshidratadas que se organizan en capas estratificadas. Estas células se caracterizan por haber perdido su núcleo y son fisiológicamente bastante inactivas; se forman continuamente y son sustituidas por las células originadas por la capa basal del estrato germinativo que migran lentamente hacia la superficie. La capa basal constituye la capa regenerativa de la epidermis (Barry y Williams, 1995). El estrato córneo requiere un contenido máximo en humedad del 10% para mantener la flexibilidad y la suavidad de la piel. Es responsable de la función de protección que presenta la piel frente a agentes exógenos. Además, constituye la primera barrera en la absorción percutánea de cualquier fármaco (Scheuplein, 1965). El espesor de esta capa es diferente en cada región del cuerpo humano dependiendo del grado de abrasión a la que se encuentre sometida.

En las regiones de la piel con mayor espesor se produce la transición de las

células vivas, procedentes del estrato germinativo, hacia su muerte. Las células cornificadas del estrato córneo forman tres barreras: *estrato espinoso*, *estrato granuloso* y *estrato lúcido* (Figura 4). Los estratos anteriormente mencionados son fisiológicamente muy importantes para mantener el contenido de agua en la piel no modificándose la permeabilidad de la misma.

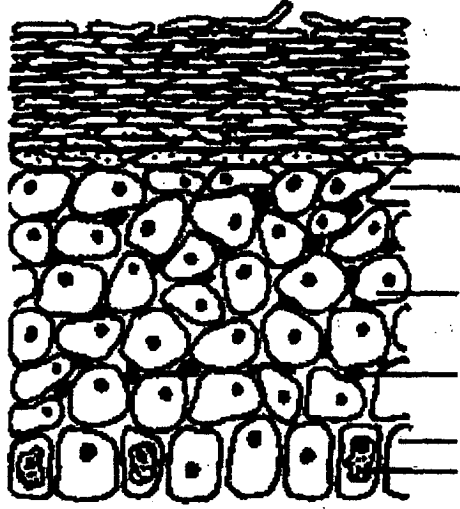
ANATOMÍA	ESPESOR (μm)
 <div style="display: flex; flex-direction: column; align-items: flex-end; margin-left: 10px;"> <div>Estrato córneo</div> <div>Estrato lúcido</div> <div>Estrato granuloso</div> <div>Estrato espinoso</div> <div>Desmosoma</div> <div>Estrato germinativo</div> <div>Melanocito</div> </div>	<div>10-50</div> <div>2-5</div> <div>50-100</div> <div></div> <div>5</div>

Figura 5. Anatomía de la epidermis humana.

- Dermis: los estudios de microscopía electrónica han permitido determinar la estructura de la dermis. Esta capa está formada por una red de fibras gruesas de colágeno, con un grosor bastante uniforme y por moléculas de tropocolágeno. Esta red es responsable de las propiedades elásticas de la piel.

Debajo de la dermis se encuentra el tejido fibroso, que se extiende y fusiona con el tejido subcutáneo que está constituido por grasas. La parte superior de la dermis está formada por papilas que se proyectan hacia la epidermis. Estas papilas contienen vasos sanguíneos, linfáticos y terminaciones nerviosas, siendo estas últimas las únicas que llegan a la zona germinativa de la epidermis (Barry y Williams, 1995).

- Tejido subcutáneo: es una capa de tejido areolar constituido por grasas que sujeta la dermis con las estructuras subyacentes.

2.2.2.- Composición bioquímica de la piel

- Queratinización: los tests bioquímicos indican que, en condiciones normales, en la región de la capa granular de la piel humana existe un sistema altamente energético localizado en el citoplasma de las células epidermales, que es el responsable de la síntesis de queratina a partir de polipéptidos. En esta capa granular las cadenas polipeptídicas son desdobladas y destruidas para ser resintetizadas en moléculas de queratina. La queratina se encuentra en la cubierta de las células córneas situada debajo de la membrana protoplasmática (Barry y Williams, 1995). Cuando se produce el proceso de queratinización ocurre una disminución en los fosfolípidos de la piel y un

aumento en el contenido de los triglicéridos y ésteres de esterol.

- **Composición lipídica:** la síntesis de lípidos incrementa en el estrato granuloso disponiéndose en múltiples bicapas denominadas gránulos cubiertos de membrana (cuerpo de Odland) que presentan un tamaño aproximadamente de 100-300 nm. En la parte superior del estrato córneo estos gránulos vacían su contenido en el espacio intracelular. Se produce una acumulación de lípidos y un cambio parcial en la composición química originándose las capas lipídicas extracelulares (Yardley y Summerly, 1981).

Diferentes autores han estudiado la composición lipídica intracelular del estrato córneo (Yardley y Summerly, 1981; Lampe y cols., 1983; Ritschel y Hussain, 1988). Los resultados obtenidos han demostrado que los lípidos predominantes son los de baja polaridad. Elias y cols. (1991) especificaron las diferencias regionales del contenido lipídico y la composición del estrato córneo:

	<i>Abdomen</i>	<i>Pierna</i>	<i>Cara</i>	<i>Planta</i>
Lípidos polares	4,9 %	5,2 %	3,3 %	3,2 %
Sulfato de colesterol	1,5 %	6,0 %	2,7 %	3,4 %
Lípidos neutros	74,8 %	65,7 %	66,4 %	60,4 %
Esfingolípidos	18,1 %	25,9 %	26,5 %	34,8 %
Contenido lipídico de estrato córneo	6,5 %	4,3 %	7,2 %	2,0 %

Tabla II. Composición lipídica del estrato córneo. Datos cuantitativos de la piel abdominal:

Lípidos polares: fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, esfingomielina, lisolecitina.

Lípidos neutros: esteroides libres (14 %), ácidos grasos libres (19,3 %), triglicéridos (25,2 %), ésteres de esterol (5,4 %), escualeno (4,8 %), n-alcanos (6,1 %).

Esfingolípidos: ceramida I (13,8 %), ceramida II (4,3 %), glucosilceramida I y II (trazas).

Las diferencias en la permeabilidad de la piel pueden estar relacionadas con el contenido lipídico presente en cada región. Así, un elevado contenido lipídico dará lugar a una baja permeabilidad.

- **Ácidos grasos:** los dos ácidos grasos esenciales insaturados que constituyen la piel son el ácido linoleico y araquidónico. El ácido linoleico parece ser que desempeña un papel importante en las funciones de defensa que ejerce la piel.

- **Proteínas:** a nivel de la piel se ha localizado una proteinasa, activa a pH fisiológico, que modula la respuesta inflamatoria cuando existe daño celular.

2.2.3.- Sistema circulatorio de la piel

Las arterias que irrigan la piel tienen su origen en los vasos situados en la capa de tejido conectivo subcutáneo, los cuales forman un plexo arterial justamente debajo de la piel. Las bifurcaciones de este plexo irrigan los folículos pilosos, los apéndices

glandulares, el tejido subcutáneo y la dermis. Las bifurcaciones arteriales del plexo, se dividen en las regiones más internas de la dermis formando un plexo subpapilar. Las arteriolas procedentes de este segundo plexo penetran en la parte superior de la dermis. Estas arteriolas tienen un diámetro de 50 μm y presentan anastomosis arteriovenosa que está presente a todos los niveles del sistema circulatorio de la piel.

Algunas de las bifurcaciones arteriolas forman otro plexo subpapilar, menos profundo que el anterior, que aporta ramificaciones pequeñas a la dermis y capilares ramificados de muy pequeño diámetro a las papilas situadas en la interfaz de la dermis y la epidermis.

En la piel, las venas se organizan, al igual que las arterias, formando un plexo subpapilar y un plexo subdermal. Los vasos sanguíneos presentan anastomosis arteriovenosa que permite conducir el flujo sanguíneo directamente desde los capilares al drenaje venoso. Este mecanismo permite regular la temperatura del cuerpo humano y la presión sanguínea. El aporte de sangre llega a una distancia aproximada de 100 a 200 μm de la superficie de la piel, por tanto, si algún compuesto químico atraviesa la piel, se puede transportar sistémicamente hasta una profundidad aproximada de 150 μm . Se ha estimado que, la superficie vascular adecuada para el intercambio de sustancias entre los tejidos y la sangre es de 1 a 2 cm^2 por centímetro cuadrado de piel. A temperatura ambiente el flujo sanguíneo en la piel es de 0,05 ml/min por centímetro cúbico de piel. La circulación periférica en la piel se puede aumentar o disminuir mediante el uso de vasodilatadores o vasoconstrictores, respectivamente (Scheuplein y Blank, 1971; Gordon, 1990).

El sistema linfático que irriga la piel se extiende dentro de las capas papilares de la dermis, donde se forma una densa malla de capilares linfáticos. Los vasos linfáticos poseen un plexo más profundo en el límite interno de la dermis. La epidermis es vascular y se encuentra irrigada por difusión desde la circulación papilar (Gordon, 1990).

2.2.4.- Funciones de la piel

Las funciones de la piel se encuentran esquematizadas en la tabla III. Entre las funciones desempeñadas por la piel destacan las funciones de contención y de protección frente a agentes externos, por tener particular relevancia en la administración tópica de principios activos a través de la piel.

La *función de contención* determina la capacidad que posee la piel de confinar los tejidos subyacentes y restringir sus movimientos. La fuerza necesaria para poder desempeñar este papel, la obtiene a partir de la matriz fibrosa de colágeno y elastina localizada en la dermis. Debido a sus propiedades elásticas, la piel es capaz de recuperar su estado normal tras finalizar los estiramientos producidos por los movimientos del cuerpo humano. Con el paso del tiempo, la piel pierde elasticidad y se incrementan las fuerzas de tensión a las que se encuentra sometida. Esta pérdida de elasticidad es mayor cuando la piel se ve afectada por radiaciones ultravioletas (luz solar). La epidermis no

debe sufrir ningún tipo de resquebrajamiento o rotura puesto que constituye la primera línea de defensa contra las infecciones.

Funciones de la piel

Contención de los fluidos y tejidos del cuerpo humano.
Protección contra el daño que pueden producir diferentes agentes externos:
Protección microbiana
Protección frente a productos químicos
Protección térmica
Protección eléctrica
Recepción de estímulos externos
Tacto
Dolor
Temperatura
Regulación de la temperatura del cuerpo
Síntesis y metabolismo
Distribución de los desechos bioquímicos (en secreciones glandulares)
Identificación intraespecie y/o atracción sexual
Regulación de la presión sanguínea

Tabla III. Funciones de la piel.

La principal función del estrato córneo es mantener la integridad de la piel cuando ésta se encuentra sometida a estrés mecánico. Su flexibilidad depende de las diferentes condiciones por las que se pueda ver afectada. La capacidad de la piel para resistir los fenómenos de ruptura, reside en el estrato córneo. Su elasticidad se debe al balance existente entre los lípidos, sustancias hidrosolubles y agua, en conjunción con las proteínas de queratina. Para mantener la elasticidad el contenido en humedad debe estar próximo al 15% el cual se mantiene con la presencia de sustancias hidrosolubles y lípidos. La falta de humedad adecuada provoca en la superficie de la piel grietas, roturas y fisuras debido a fenómenos de estrés mecánico (Gordon, 1990). El estrato córneo impide la entrada de agentes exógenos en la piel, permitiendo únicamente el paso a su través de moléculas de tamaño intermedio y pequeño por mecanismos de difusión. Constituye una barrera para los microorganismos impidiéndoles alcanzar los tejidos que podrían constituir el medio idóneo para su crecimiento, evitándose así posibles procesos infecciosos (Loth, 1989).

A nivel de la piel se producen varios procesos fisiológicos que dan lugar a condiciones inadecuadas para el crecimiento de microorganismos. El carácter ácido de las secreciones sebáceas provoca un descenso del pH de la piel. Este "manto ácido" proporciona un pH con valores comprendidos entre 4,2 y 5,6, lo que le confiere propiedades bacteriostáticas. Además, las secreciones sebáceas contienen ácidos grasos de cadena corta que presentan acción bacteriostática y fungistática. La sequedad de la piel constituye un factor negativo para el crecimiento microbiano (Gordon, 1990).

Los orificios glandulares constituyen una puerta de entrada para los microorganismos patógenos hacia el interior del organismo. Las glándulas sebáceas son propensas a ser ocluidas e infectadas por estos microorganismos. Este tipo de

infecciones están muy localizada, sin embargo, si la glándula sebácea sufre internamente una ruptura, la infección puede extenderse hacia zonas más profundas y el cuerpo humano reacciona aislando la infección mediante la formación de un quiste.

El conducto folicular piloso es otra posible entrada de microorganismos, que permanece abierto en la etapa de crecimiento del pelo.

2.3.- Vías de absorción a través de la piel

Como hemos comentado anteriormente, una de las funciones de la piel es impedir el paso de cualquier sustancia extraña a través de ésta. Esta función es realizada por el estrato córneo que es casi impermeable y además, regula la cantidad del fármaco que se absorbe a través de la piel.

Existen dos rutas principales de absorción a través del estrato córneo (Barr, 1962):

1) *a través de los apéndices de la piel* (incluyen los conductos de las glándulas sebáceas, sudoríparas y particularmente los folículos pilosos que constituyen el 0,1% de la superficie de la piel)

2) *ruta transepidermal.*

Cualquiera de estas rutas principales puede desempeñar un papel más importante que la otra durante el proceso de absorción de un determinado compuesto. No obstante, ambas rutas, realizan una función esencial en la absorción de la mayoría de los compuestos. La importancia de estas rutas en el proceso de absorción radica en las características físico-químicas del compuesto que se absorbe.

La figura 6 muestra las posibles rutas de absorción a través de la piel:

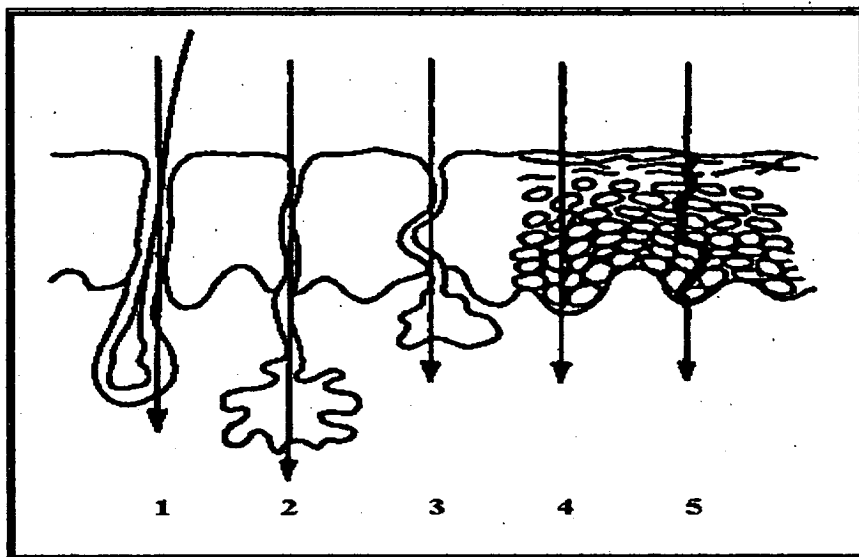


Figura 6. Rutas de absorción percutánea..

Existe un tipo de difusión que se produce inmediatamente después de la aplicación del fármaco sobre la superficie de la piel, conocida como difusión fugaz. Este tipo de difusión se produce fundamentalmente a través de los apéndices. Sin embargo, una vez que se alcanza el estadio estacionario, la difusión se produce mayoritariamente a través de la matriz del estrato córneo (Scheuplein, 1967).

La superficie relativa disponible para la ruta transcelular es aproximadamente del 99 %, 0,7 % para la ruta intercelular y 0,3 % para la ruta transfolicular. Los volúmenes relativos del estrato córneo disponibles para las rutas transcelular, intercelular y transfolicular son del 90-99 %, 1-10 % y 0,1 %, respectivamente. La distancia del trayecto difusional para estas rutas son de 25 μm , 359 μm y 200 μm , respectivamente.

2.3.1.- Absorción a través de los apéndices

Las tres posibles rutas de absorción a través de los apéndices son: 1º) a través de la pared de los folículos pilosos (Figura 6.1), 2º) a través de las glándulas sudoríparas (Figura 6.2) y 3º) a través de las glándulas sebáceas (Figura 6.3).

La difusión a través de las unidades pilosebáceas y glándulas sudoríparas se conoce como "*shunt diffusion*". Cada folículo piloso está conectado con las glándulas sebáceas que vierte sus secreciones dentro del canal folicular situado cerca de la superficie de la piel. Los fármacos que se administran sobre la superficie de la piel alcanzan directamente los orificios de las glándulas sudoríparas y folículos pilosos. El fármaco atraviesa rápidamente este sistema de canales y conductos alineados con el epitelio escamoso estratificado. Por lo tanto, el camino más probable para la absorción de un fármaco vía ruta transfolicular es a través de los espacios microscópicos existentes entre el canal piloso, permitiendo el paso del fármaco a través del estrato córneo.

Esta ruta puede ser importante para la absorción de moléculas polares de gran tamaño, electrolitos con valores bajos en la constante de difusión o compuestos de baja solubilidad. Los folículos pilosos debido a su alta permeabilidad podrían ser responsables de la absorción rápida, aunque de pequeña magnitud, que se ha observado en la administración de numerosos fármacos.

2.3.2.- Absorción transepidermal

Se cree que el transporte pasivo a través de la *ruta transepidermal* es la principal ruta de absorción para la mayoría de los fármacos administrados, principalmente moléculas pequeñas que no sean electrolitos.

Los fármacos pueden atravesar la epidermis por la ruta transcelular (mayor resistencia al paso de las moléculas) (Figura 6.4) ó por la ruta intercelular (baja resistencia al paso de las moléculas) (Figura 6.5). Algunos autores consideran la difusión transcelular como la principal vía de absorción por estar constituida por zonas

de carácter hidrófilo e hidrófobo y por presentar mayor área superficial. Para otros autores, la ruta intercelular es la predominante (Guy y Hadgraft, 1988).

2.4.- Factores que afectan a la absorción percutánea de fármacos.

Los factores que pueden influir en la absorción de fármacos a través de la piel, se clasifican en factores fisiológicos, patológicos, físico-químicos y factores dependientes de la formulación.

2.4.1.- Factores fisiológicos y patológicos

- Estado de la piel: el principal factor para prevenir el paso de moléculas a través de la piel es la ausencia de cualquier tipo de lesión u otras anomalías que afecten a su integridad. Si la piel no presenta un estado fisiológico adecuado, no se pueden tener en cuenta todas las limitaciones consideradas en el proceso de absorción. Determinados agentes químicos como gases, ácidos, álcalis producen daño en la piel aumentando su permeabilidad.

- Procesos patológicos: las enfermedades de la piel que provocan anomalías en el estrato córneo, como ocurre con las dermatosis que originan paraqueratosis (ej., psoriasis y eccema), están asociadas a un incremento en la absorción percutánea. En un principio se creía que la mayoría de las dermatosis, originadas en la piel, se debían a anomalías en el metabolismo proteico de la epidermis. Estudios posteriores demostraron que estos procesos patológicos estaban relacionados con deficiencias en el metabolismo lipídico de la piel (Elias, 1981).

También se ha observado un aumento en la absorción percutánea cuando la piel es dañada por acción de agentes externos (materiales corrosivos, radiaciones ultravioletas, cortes y fenómenos abrasivos). En todos estos casos se altera considerablemente la capacidad normal que posee la piel para funcionar apropiadamente y actuar como barrera química.

- Edad: la absorción de compuestos a través de la piel de niños, jóvenes y ancianos es mayor que a través de la piel de adultos. Así, en niños la absorción es mayor debido a que presentan mayor área superficial por unidad de peso. En estos grupos de población se han producido numerosos efectos secundarios y muertes debido a la absorción de determinados compuestos (hexaclorofeno, esteroides potentes y ácido bórico) (Graham, 1995).

- Flujo sanguíneo: el incremento en el flujo sanguíneo produce un aumento en la velocidad de transporte de las moléculas que difunden dando lugar a un mayor gradiente de concentración entre la piel y los tejidos localizados a nivel de la dermis. Esto da lugar a un incremento en la absorción de los compuestos (Ritschel y Hussain, 1988). La velocidad del flujo sanguíneo en la piel es aproximadamente de 5 ml/min/100 g de tejido.

- Variabilidad regional de la piel: la permeabilidad de la piel se define matemáticamente como $D_s K/h$. Por lo tanto, la absorción depende de las características de la piel, del tipo de formulación y del principio activo administrado. En el cuerpo humano existe variabilidad en el espesor de la piel, así, cuanto menor es el grosor (palma de las manos y los pies) mayor es el coeficiente de difusión. El incremento del espesor de la piel es inversamente proporcional al coeficiente de difusión, lo que origina que las diferencias en la permeabilidad entre las distintas regiones del cuerpo humano sean menores de las esperadas.

La difusividad de pequeñas moléculas a través de la piel disminuye en el siguiente orden: planta del pie > palma de la mano > dorso de la mano > escroto > axilas y cráneo > brazos > piernas > tronco (Ritschel y Hussain, 1988). La difusividad está influenciada por la composición y la concentración lipídica en el estrato córneo y por la localización y el número de células. También se han observado grandes diferencias entre individuos, sin ninguna patología en la piel, en la cantidad de fármaco absorbida a través de una determinada zona del cuerpo humano (Feldman y Mainbach, 1967).

- Variación entre especies: el hombre y los animales presentan grandes diferencias en las características físicas de la piel en relación al número de aberturas de los apéndices por unidad de superficie y espesor del estrato córneo. Estas diferencias afectan a las posibles rutas de absorción y a la resistencia que puede ofrecer la piel a los fenómenos de absorción.

Se ha observado, que la piel de los roedores utilizados en los laboratorios de investigación presenta mayor permeabilidad que la del ser humano (Ronald y cols., 1992).

El orden de permeabilidad de la piel de las distintas especies utilizadas en los estudios de absorción es conejo > rata > cobaya > hombre, aunque la relación entre especies no es la misma para cualquier sustancia (Idson, 1975).

- Metabolismo: la epidermis y la dermis presentan enzimas con actividad catabólica. La epidermis constituye el estrato de la piel con más capacidad metabólica y puede modificar químicamente un gran número de moléculas con posibilidad de atravesar la piel. Los principios activos que se administran por esta vía pueden sufrir procesos catabólicos y se puede ver afectada la biodisponibilidad, como ocurre con esteroides y profármacos. Es importante evaluar el efecto de la acción metabólica sobre la actividad del fármaco que se administra a través de la piel.

Entre las numerosas reacciones que se producen durante el metabolismo de la piel, catalizadas por los enzimas presentes en la misma, destacan la oxidación, reducción, hidrólisis y conjugación (formación de glucurónidos y sulfatos), metilación y la conjugación con glutatión (Walters, 1995). La capacidad de biotransformación que posee la piel se considera positiva desde el punto de vista de la administración de profármacos y su posterior liberación a la forma activa, y negativa con respecto a la activación de xenobióticos que dan lugar a productos tóxicos (Bronaugh y cols., 1989; Higo y cols., 1992).

Se han realizado diferentes experimentos con el fin de evaluar el efecto metabólico cutáneo en distintas especies de animales. Se ha observado que, en monos rhesus el intervalo de la dosis inicial de nitroglicerina comprendida entre el 16% y 21% se metaboliza durante el proceso de absorción percutánea (Wester y cols., 1983). Otros estudios realizados sobre piel humana o animal han evaluado varios factores que desempeñan un papel importante en los procesos metabólicos durante la administración transdérmica de fármacos (Williams y cols., 1990; Higo y cols., 1992). Además, la presencia en la piel de enzimas bacterianos puede provocar otro proceso de inactivación de los fármacos administrados por esta vía (Denyer y cols., 1985).

2.4.2.- Factores físico-químicos que influyen en el proceso de absorción

- **Hidratación:** la hidratación constituye uno de los factores físico-químicos más importantes. Incrementa la permeabilidad de todos los compuestos, polares y no polares, que se absorben a través de la piel.

La hidratación de la piel se puede producir por diferentes causas: 1º) difusión de agua desde las capas situadas debajo de la epidermis hacia la superficie de la piel, 2º) oclusión, utilizando un plástico impermeable que cubra la zona de aplicación del medicamento, favoreciéndose la absorción a nivel sistémico, 3º) mediante el empleo en la formulación de excipientes insolubles como parafina. Estos tipos de excipientes son capaces de mantener una película sobre la piel que impide la pérdida de agua y aumentado su contenido en humedad. Sin embargo, los humectantes y los emulsificantes empleados en la formulación, a veces tienden a disminuir el contenido en humedad de la piel. Los fenómenos de deshidratación causan un aumento de la absorción al producir daño en la estructura física del estrato córneo.

Las sustancias hidrosolubles que se encuentran en la superficie de la piel constituyen el factor natural de humectación, siendo las responsables de su hidratación. La hidratación puede originar un incremento en la permeabilidad de la piel del orden de 4 a 5 veces. Un alto nivel de hidratación favorece la penetración de muchos principios activos, como por ejemplo esteroides, ácido nicotínico y ácido salicílico, pero no de moléculas pequeñas con carácter polar como el metanol y el etanol (Ritschel y Hussain, 1988).

El mecanismo de transporte de un fármaco a través del estrato córneo hidratado es muy diferente al que ocurre en condiciones fisiológicas normales. La hidratación de la piel provoca un aumento del tamaño de los poros, alteración física de los tejidos, cambios en los coeficientes de difusión y coeficientes de actividad del fármaco que se absorbe (Barr, 1962).

- **Temperatura:** las temperaturas elevadas pueden incrementar la absorción de los fármacos de dos maneras: 1º) aumento de la velocidad de difusión de cualquier sustancia en contacto con la superficie de la piel por incremento del movimiento molecular, y 2º) inducción de la vasodilatación de los vasos sanguíneos localizados en la piel.

La velocidad de difusión puede incrementarse por disminución de la viscosidad de los constituyentes lipídicos que forman parte de la superficie de la piel, facilitándose de esta manera la mezcla de dichos constituyentes con la formulación administrada. El coeficiente de difusión de un fármaco es inversamente proporcional a la viscosidad y por lo tanto depende de la temperatura.

No obstante, la temperatura no constituye un factor importante en la absorción del principio activo. Se ha demostrado que un aumento de la temperatura puede incrementar la absorción del fármaco del orden de cuatro o cinco veces en función del principio activo, método empleado, aumento de la temperatura y humedad relativa. El efecto que ejerce la temperatura sobre el incremento de la permeabilidad es pequeño comparado con el efecto ejercido por la hidratación de la piel (Ritschel y Hussain, 1988).

- Concentración del fármaco: el efecto de la concentración, como factor que regula la cantidad de fármaco que se absorbe a través de una membrana, se puede evaluar por la ley de difusión de Fick. Esta ley establece que la fuerza de conducción causante de la difusión de una sustancia desde una zona de mayor a menor concentración es proporcional al gradiente de concentración.

En un amplio intervalo de concentraciones, el flujo será proporcional a la concentración cuando la piel se mantenga inalterada por las soluciones concentradas de fármaco y los coeficientes de partición sean constantes en todo el intervalo de concentración.

La cantidad de fármaco absorbido a través de la piel por unidad de superficie y por intervalo de tiempo aumenta a medida que lo hace su concentración. Además, la cantidad de fármaco absorbida por unidad de tiempo, a una concentración constante de fármaco, se verá incrementada si esta se administra sobre una mayor superficie de la piel (Ritschel y Hussain, 1988).

- Solubilidad: las características de solubilidad de una sustancia influyen considerablemente en su capacidad para atravesar membranas biológicas. La concentración de fármaco presente en lugar de absorción está determinada por su solubilidad acuosa y el coeficiente de reparto tiene una gran influencia en la velocidad de difusión a través del lugar de absorción.

Katz y Shaikh (1965) demostraron, mediante la utilización corticoesteroides tópicos, que la eficacia de la absorción percutánea de un compuesto está relacionada con el producto de su coeficiente de reparto vehículo/estrato córneo y la raíz cuadrada de su solubilidad en agua. Cuando el fármaco es mucho más soluble en el estrato córneo que en el vehículo en el cual se encuentra disuelto, presentará mayor tendencia a concentrarse en las primeras capas del estrato córneo antes de alcanzar la circulación sistémica. Por el contrario, la concentración de fármaco en las capas inferiores del estrato córneo sería prácticamente inexistente, al estar estas capas en contacto con la sangre que se renueva continuamente. Por lo tanto, el flujo está relacionado con el gradiente de concentración existente entre las capas localizadas en la parte superior e inferior del estrato córneo.

Cuando el estrato córneo constituye el paso limitante, la velocidad de absorción no está influenciada por los cambios de concentración del fármaco en el vehículo, ya que el gradiente de transporte a través de la membrana no está afectado. Si la difusión del fármaco desde el vehículo constituye el paso limitante, un incremento en la concentración producirá un aumento en la velocidad de absorción del fármaco. Si el gradiente existe en el estrato córneo y en el vehículo, el flujo dependerá de la concentración en el vehículo.

- **Peso molecular:** el estrato córneo actúa como barrera e impide el paso de moléculas con pesos moleculares mayores de 300 Da. Parece que existe una relación inversa entre la cantidad absorbida y el peso molecular. Así, las moléculas pequeñas se absorben más rápidamente que las moléculas de gran tamaño, pero en un intervalo estrecho de pesos moleculares existe poca correlación entre tamaño y cantidad absorbida.

El efecto específico que puede tener el tamaño y la forma de las moléculas sobre la cantidad absorbida se puede determinar únicamente, si el efecto del tamaño y la forma se puede separar del efecto de las características de solubilidad.

Además, se ha observado que la absorción de los compuestos con peso molecular elevado es muy variable (Tregear, 1966).

- **Polimorfismo:** las formas polimórficas de un principio activo presentan diferencias en la solubilidad y estabilidad física que afectan a su absorción y semivida de eliminación. Las modificaciones moleculares realizadas sobre el principio activo influyen en su solubilidad, coeficiente de reparto entre la formulación y el estrato córneo y porcentaje de difusión. Un fármaco puede ser modificado con el fin de conseguir una actividad intrínseca diferente o formar un profármaco que facilite la absorción del fármaco pasando a su forma activa una vez metabolizado (Barry, 1988).

- **Efecto reservorio del fármaco:** la unión de los fármacos a los tejidos que constituyen la piel puede afectar a un gran número de parámetros en el desarrollo galénico de formulaciones destinadas a la administración tópica. La capacidad de ciertos agentes de la formulación para unirse a la queratina en el estrato córneo constituye un factor importante para la efectividad del fármaco. El desarrollo de formas farmacéuticas de administración tópica para obtener efectos sistémicos, necesita de una primera dosis del principio activo (ej.: escopolamina) con la intención de saturar los sitios de unión en el estrato córneo o para aportar una dosis de choque. Algunos fármacos, como los esteroides, forman depósitos en el estrato córneo desde donde se liberan lentamente con el tiempo (Graham, 1995).

2.4.3.- Características de la formulación

- **pH:** la absorción de compuestos de carácter ácido y base depende considerablemente del pH del vehículo en donde está formulado. El pH de la formulación influye en el grado de ionización y en el porcentaje de formación de las formas ionizadas y no ionizadas del fármaco debido a que, muchos de los principios

activos empleados son ácidos o bases débiles. La proporción en la que se encuentran las formas ionizadas y no ionizadas determinará el coeficiente de reparto del fármaco entre el vehículo y el estrato córneo, además, el coeficiente de difusión de estas dos formas probablemente será diferente. El pH además tiene efecto en la solubilidad total del principio activo, concentración del fármaco disuelto en una suspensión y en el coeficiente de partición de del fármaco y los excipientes, como es el caso de los conservantes, entre la fase acuosa y oleosa de un sistema disperso (Graham, 1995).

Este parámetro afecta al grado de ionización de los electrolitos. Aunque las moléculas no ionizadas normalmente presentan mayor permeabilidad, la cantidad absorbida no tienen que ser necesariamente proporcional a la concentración de la forma no ionizada del fármaco en el vehículo (Menszel y Goldbery, 1978).

-Vehículo: el vehículo de una forma farmacéutica de administración tópica puede influir en la liberación y en la difusión del principio activo. El principal requisito en la administración percutánea de fármacos consiste en que el fármaco incorporado en el vehículo alcance la superficie de la piel en una proporción adecuada y en cantidades significativas. El factor principal que influye en el proceso de absorción es la capacidad del fármaco de atravesar de la piel por sí mismo, en el cual el vehículo desempeña un de vital importancia. Así, desde que el vehículo se aplica en el lugar de administración, éste interviene en la absorción del principio activo.

La cantidad de fármaco cedido desde el vehículo está regulada por el coeficiente de reparto entre el vehículo y el estrato córneo. Otros factores de importancia que relacionan al vehículo y al fármaco incorporado es el tamaño de partícula del fármaco suspendido y la concentración del fármaco en el vehículo. La eficacia de los distintos vehículos en favorecer el proceso de absorción de los fármacos, se puede predecir teniendo en cuenta su efecto sobre: 1º) la hidratación del estrato córneo o 2º) efecto que ejerce el agua sobre el estrato córneo influyendo en el coeficiente de reparto estrato córneo/vehículo. Los vehículos pueden afectar a la absorción de fármacos a través del estrato córneo por su capacidad de reducir la pérdida de vapor de agua sobre la superficie de la piel (Ferreira y cols., 1995).

La composición de muchos vehículos cambia con el tiempo debido a la pérdida de ingredientes volátiles tales como el agua en las emulsiones y los alcoholes en las lociones. Estos fenómenos de volatilización producen un aumento en la concentración de los componentes no volátiles, afectando a la solubilidad de la forma activa y provocando su precipitación. Se pueden producir alteraciones en los caminos de difusión dentro del vehículo, inversión de fases en emulsiones y un incremento de la viscosidad de los geles.

La viscosidad del vehículo puede desempeñar un papel de vital importancia en la cantidad de fármaco que se libera desde el vehículo a la superficie de la piel. Diferentes autores han confirmado que existe una relación inversa entre el coeficiente de difusión del fármaco dentro del vehículo y la viscosidad del vehículo, como indica la ecuación de Stokes-Einstein (Graham, 1995). Se ha visto por ejemplo, que la cantidad liberada de piroxicam, berberina, ácido salicílico, morfina y benzocaína, desde diferentes clases de

hidrogeles, disminuye a medida que aumenta su viscosidad (Hosoya y cols. 1998; Tsai y cols., 1999; Laugel y cols., 2000).

- **Aditivos:** los tensioactivos se caracterizan por su capacidad de formar micelas, en suspensiones y emulsiones, que aumentan la solubilidad del principio activo y disminuyen su concentración en la forma farmacéutica, permitiendo la difusión a través del estrato córneo. Los tensioactivos actúan como exaltadores de la permeabilidad ya que disminuyen la tensión interfacial entre la formulación y el estrato córneo, pudiendo incrementar la difusión a través de la piel.

Algunos excipientes afectan a la capacidad del principio activo de difundir a la superficie de la piel y atravesar el estrato córneo e incluso pueden alterar su estructura. Entre estos compuestos se encuentran determinados compuestos que pueden formar complejos con el principio activo y disminuir su difusividad, humectantes que reducen el contenido en humedad de la piel o compuestos volátiles que se evaporan y aumentan la concentración del principio activo.

Se han empleado determinados aditivos como el cloruro sódico, glicerol y glucosa como agentes osmóticos, que se incorporan en la fase interna de emulsiones múltiples del tipo a/o/a (acuoso-oleo-acuosa). Estos agentes osmóticos generan un gradiente osmótico que se desarrolla entre las dos fases acuosas de la emulsión múltiple provocando la migración de moléculas de agua desde la fase acuosa externa a la interna. Debido a este fenómeno, se produce un hinchamiento de las gotículas acuosas de la fase interna y una disminución en el grosor de la capa oleosa en la superficie de ambas fases acuosas, dando lugar a un aumento de la cantidad de fármaco liberado (Mishra y Pandit, 1989).

2.5.- Mejora de la absorción a través de la piel

La situación óptima en el proceso de absorción se produce cuando el fármaco que se administra, es capaz de atravesar, por sí mismo, las distintas capas que constituyen la piel y llegar a la circulación sistémica produciendo un efecto terapéutico. Entre los fármacos que presentan esta propiedad destacan la escopolamina, nitroglicerina, clonidina, estradiol, fentanilo, testosterona y nicotina. El objetivo fundamental para cualquier compuesto administrado por esta vía es conseguir la biodisponibilidad suficiente, no necesariamente absoluta, que le permita obtener un efecto terapéutico.

Se emplean diferentes técnicas con el fin de reducir la resistencia al estrato córneo y la variabilidad biológica. De esta manera se logra incrementar o mejorar la absorción de determinados fármacos, que administrados en formas farmacéuticas, presentan dificultades en atravesar la piel y alcanzar el torrente circulatorio. Para decidir cuales de estas técnicas deben emplearse se deben tener en cuenta una serie de factores: 1) propósito de la medicación (tópica o sistémica), 2) características físico-químicas del fármaco (coeficiente de reparto, difusividad, solubilidad y permeabilidad), 3) interacciones físicas y químicas entre la molécula que difunde, promotor de la

absorción, vehículo y piel y 4) respuestas toxicológicas como fenómenos de irritación localizada, reacciones cutáneas y toxicidad sistémica.

2.5.1.- Clasificación de los métodos empleados para incrementar la absorción de fármacos a través de la piel

-a) Incremento de la permeabilidad por métodos químicos (promotores de la absorción): el promotor ideal empleado para incrementar la permeabilidad de los fármacos debe cumplir los siguientes requisitos (Chen y Chein, 1999):

- Farmacológicamente inerte.
- No tóxico, no irritante y no alergénico.
- Acción rápida y duración predecible, adecuada para el fármaco empleado.
- Una vez que deja de ejercer su acción, el estrato córneo debe recuperar de manera inmediata y total sus propiedades de barrera.
- Reducción de la función de barrera en una sola dirección para que no se produzca pérdida del material endógeno.
- La función de barrera debe reducirse en una sola dirección
- Compatible física y químicamente con el fármaco y excipientes de la formulación.
- Pueda incorporarse sin ningún tipo de problemas a la formulación.
- Barato y que no presente olor, color y sabor.
- Excelente solvente para los fármacos.

Para clarificar el modo de acción de los promotores de la absorción y optimizar el efecto de tales agentes se emplean una serie de técnicas: 1) ensayos in vitro de absorción, 2) calorimetría diferencial de barrido (DSC), 3) infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), 4) resonancia magnética nuclear (RMN), 5) rayos X y 6) espectroscopia Raman (Barry y Williams, 1995).

Los promotores de la absorción se pueden clasificar en cinco grupos en función de los mecanismos de acción (Tabla IV):

1.- Solventes: en este grupo se encuentran los alcoholes, siendo el etanol el más utilizado. Se ha observado, mediante ensayos in vitro, que el etanol incrementa y mejora la permeabilidad de levonorgestrel, estradiol, hidrocortisona, 5-fluorouracilo, ión salicilato y nitroglicerina. El empleo de concentraciones altas de etanol y otros alcoholes pueden extraer los lípidos del estrato córneo y deshidratar las membranas que lo constituyen. También, pero de manera menos frecuente, se emplean alcanoles como promotores de absorción de distintos compuestos como el alcohol laurílico y linolénico, 1-octanol y 1-propanol (Barry y Williams, 1995).

Los glicoles se emplean frecuentemente en preparaciones tópicas y cosméticas, y son varios los que se han estudiado como promotores potenciales. El propilenglicol incrementa de forma moderada la permeabilidad del 5-fluorouracilo y estradiol. Se ha demostrado, en estudios recientes, que el PEG 400 actúa como promotor incrementando la difusión de la nortriptilina en ensayos de cesión (Moreno y cols., 2000). También,

aumenta la absorción de diferentes fármacos como el estradiol y el oxaprozin. Sin embargo, se ha observado que determinados glicoles inhiben la difusión de los fármacos como es el caso del butano-1,2-diol y el propano-1,3-diol (Yu y cols., 1988; Mollgaard y Hoelgaard, 1989).

El Azone® (1-dodecilazacicloheptan-2-ona) se caracteriza por producir poca irritabilidad y por ser activo a bajas concentraciones. Diferentes estudios han demostrado que presenta efectos sinérgicos con el propilenglicol. Incrementa el paso a través de la piel de una gran variedad de fármacos como es el caso de esteroides, antibióticos y moléculas hidrófilas y lipófilas. Su efecto es dosis dependiente. Los derivados sintetizados del Azone® son efectivos en incrementar la absorción de fármacos con un amplio rango de lipofilias a través de piel de ratón y rata (Yu y cols., 1988).

La dimetilacetamida (DMAC) y la dimetilformamida (DMF) favorecen la absorción percutánea in vitro de griseofulvina y hidrocortisona. La DMAC aumenta la permeabilidad in vitro de lidocaina y los flujos de naloxona. La DMF es un excelente promotor de la permeabilidad para compuestos modelo como el octanol o para la cafeína, betametasona y aspirina. No obstante, se han observado casos en los que produce daño irreversible en la piel provocando un incremento en la absorción de determinados fármacos. La N-metilformamida se ha utilizado para promover la absorción in vitro de un número de algunos fármacos como la hidrocortisona y progesterona (Mollgaard y Hoelgaard, 1989).

Durante las tres últimas décadas, se ha evaluado la capacidad promotora del dimetilsulfóxido (DMSO) sobre un amplio número de fármacos entre los que se incluyen antibióticos, esteroides narcóticos y salicilatos. El empleo del DMSO, a pesar de ser un excelente promotor, crea problemas ya que su actividad es dependiente de la concentración empleada. Su utilización por encima de la concentración del 60 % produce un incremento significativo de la permeabilidad, sin embargo, provoca eritema, daño irreversible de la piel, escamación del estrato córneo y desnaturalización de sus proteínas. Entre los homólogos de la serie de los alquil metilsulfóxidos, es el decilmetilsulfóxido el que presenta mayor actividad promotora favoreciendo la absorción in vitro de nicotinato de sodio, tiourea, 5 fluorouracilo y naloxona. Estudios recientes realizados han demostrado la reversibilidad de efectos de este promotor, y que son dependientes de la concentración utilizada. Distintos artículos publicados han revelado que este compuesto es efectivo para moléculas hidrófilas pero no para moléculas lipófilas (Barry y Williams, 1995).

2.- *Tensioactivos*: los tensioactivos se utilizan en determinadas formulaciones como (formas farmacéuticas, pesticidas y formulaciones cosméticas). Se clasifican, según la naturaleza del grupo hidrófilo dentro de la molécula, en aniónicos, catiónicos, anfifílicos y no-iónicos

Numerosos trabajos de investigación han demostrado que los tensioactivos aniónicos y catiónicos, como el dodecil benzenosulfonato cálcico y magnesio lauril sulfato, son irritantes de la piel, hinchan el estrato córneo e interaccionan con la queratina produciendo daño tisular.

Los tensioactivos no-iónicos (Tween[®], Brij[®] o Span[®]) aumentan poco la absorción de fármacos a través de la piel y la extensión de este efecto depende más de la configuración del tensioactivo que del balance hidrofílico-lipofílico o de la actividad superficial. También, se ha observado un incremento de la absorción de los fármacos cuando se emplean tensioactivos con varias cadenas grandes de carácter hidrófilo (ej. cinco o seis unidades de óxido de etileno). Por lo tanto, la efectividad del tensioactivo depende de la facilidad con la cual las moléculas de tensioactivos penetran las membranas lipídicas. El poco daño tisular que produce los tensioactivos no-iónicos radica en su mecanismo de acción para aumentar la absorción, modificando los fosfolípidos que constituyen la piel (Ritschel y Hussain, 1988). Así, se ha comprobado que el Tween[®] 20 (tensioactivo no-iónico) incrementa in vitro el flujo de hidrocortisona, lidocaína y 5-fluorouracilo.

3.- *Ácidos grasos y ésteres*: la absorción percutánea de fármacos se ha mejorado considerablemente incrementada mediante el empleo de ácidos grasos de cadena larga como el ácido oleico, linoleico, cáprico, láurico, esteárico, palmitoleico y mirístico, entre otros.

Diferentes estudios in vivo e in vitro han demostrado que el ácido oleico incrementa la biodisponibilidad de la betametasona, favorece la absorción de nicardipino y azidotilmidina. El ácido oleico irrita la piel produciendo edema y eritema. De los ácidos grasos que se han estudiado en un protocolo, con el fin de ver la influencia de la longitud de la cadena en la absorción de naloxona, es el ácido láurico el que presenta mayor efectividad. Las uniones dobles en posición cis de las cadenas alquil incrementan la actividad del ácido graso. Este promotor también incrementa la absorción de indometacina, testosterona y 5-fluorouracilo.

Los ésteres alquílicos de los ácidos grasos actúan como promotores de la absorción. El metil caprato incrementa la absorción de vitamina D₃, minoxidil, eritromicina, hidrocortisona y testosterona (Barry y Williams, 1995). También, se han utilizado el etil oleato, cetil hexanoato y miristato de isopropilo como promotores de la absorción, siendo este último compuesto muy utilizado en distintas formulaciones de indometacina (Loth, 1991; Miyazaki y cols., 1994).

4.- *Promotores biodegradables*: las pirrolidonas y sus derivados se consideran como promotores potenciales de numerosos fármacos. Estos promotores ejercen mayor efecto sobre fármacos hidrófilos que lipófilos.

La N-metilpirrolidona (NMP) incrementa la absorción in vitro del ácido mefenámico y la biodisponibilidad de betametasona en humanos. La 2-Pirrolodona y la NMP originan en el estrato córneo reservorios del fármaco, aunque se ha demostrado que producen eritema en algunos pacientes. La combinación de NMP y 1-lauril-2-pirrolidona, empleados como vehículos para la administración transdérmica de rojo fenol y 5 fluoruracilo, aumentan significativamente la absorción de ambos compuestos. A pesar de la marcada actividad promotora de este tipo de moléculas, su utilización esta limitada debido al daño que producen en la piel, sobre todo a concentraciones altas.

La síntesis de análogos cíclicos de urea con el fin de obtener promotores seguros

y biodegradables da lugar a compuestos con la misma efectividad que el Azone® en promover la absorción in vitro de indometacina a través de piel de serpiente y piel humana (Barry y Williams, 1995).

5.- *Otros promotores de la absorción:* los terpenos presentan un amplio espectro de acción en el campo de la medicina, sin embargo, son muy pocos los que se utilizan como promotores de la absorción. El 1,8- cineol (eucaliptol) se ha empleado como promotor de la absorción, en estudios de cesión in vitro, de un gran número de fármacos lipófilos. Además, el 1-carvone y eugenol se han patentado como promotores de la absorción. En estudios de cesión in vitro los terpenos (ej. carvone, mentol, 1,8-cineol y timol) en solución etanólica al 50% incrementan el flujo de nicotina y tamoxifeno (Gao y Singh, 1998).

Se han evaluado distintos terpenoides derivados de ciclohexanona como promotores de la absorción de indometacina y ketoprofeno en ensayos in vitro a través de piel de animales (Gao y Singh, 1998). También, se ha estudiado el efecto promotor, sobre la absorción de gran número de fármacos, de compuestos que poseen anillos azacíclicos y terpenos acíclicos con cadenas hidrocarbonadas. Se ha observado que el tamaño del anillo no influye en el efecto que poseen los promotores, aunque sí lo hace la longitud de la cadena hidrocarbonada. (Okamoto y cols., 1991).

Los aceites esenciales de eucaliptos, ylang-ylang y chenopodium se han empleado como promotores de la absorción de fármacos a través de piel humana. De todos ellos, el más activo es el eucalipto que posee la capacidad de aumentar significativamente el coeficiente de permeabilidad del 5-fluorouracilo. Un estudio realizado sobre numerosos ciclo-monoterpenos y terpenoides, como promotores del 5-fluorouracilo, ha permitido concluir que los compuestos hidrocarbonados son menos activos que los cíclicos (Williams y Barry, 1995). Los terpenos hidrocarbonados son potentes promotores, entre ellos destaca el limonano que presenta la misma efectividad que el Azone®. El mentol y la mentona incrementan la absorción del diazepam a través de piel de rata, pero en menor medida que los monoterpénos hidrocarbonados.

Se ha estudiado la capacidad de los 12 sesquiterpenos como posibles promotores de la absorción a través de la piel humana. Los promotores que presentan grupos funcionales de carácter polar son más potentes que los compuestos totalmente hidrocarbonados y los promotores con menos estructuras ramificadas son los más activos. Este tipo de promotores ejerce una mayor duración de efectos y una pobre reversibilidad de los mismos.

La urea se caracteriza por presentar un moderado efecto queratolítico. La urea se encuentra disponible al 10% en crema, otorgándole a esta crema el doble de su capacidad para retener agua en el estrato córneo de la piel. Diferentes estudios han demostrado la capacidad de la urea de incrementar la actividad y la biodisponibilidad de la hidroclorona y mejorar la absorción in vivo de indometacina. Otros estudios hacen referencia a la escasa eficacia de la urea como agente promotor de naloxona en ensayos in vitro y del nicotinato de benzilo en ensayos in vivo.

Las ciclodextrinas (CD) son oligosacáridos cíclicos de 6,7 u 8 unidades de

glucosa, α -CD, β -CD y γ -CD, respectivamente, que forman complejos de inclusión con fármacos lipófilos aumentando su solubilidad.

En los últimos años se han publicado numerosos trabajos que ponen de manifiesto la capacidad de las ciclodextrinas como promotores de la absorción. Estas moléculas actúan transportando el fármaco desde el vehículo en donde se encuentra formulado hasta la superficie de la piel, para absorberse, posteriormente, a través de ella (Fromming y Szejtli, 1999).

Las γ -CD se han empleado para aumentar la absorción de beclometasona dipropionato, puesto que incrementa la cantidad de fármaco que se cede desde el vehículo en el que se encuentra formulado, debido a la complejación del fármaco con γ -CD. (Uekama y cols., 1985). También, se ha evaluado la relación in vivo/in vitro que puede existir en la absorción percutánea de fármacos desde pomadas constituidas por complejos de β -CD y 2,6-di-O-metil- β -CD (DIMEB) con prednisolona. La cantidad cedida desde estas formulaciones podría explicarse por un incremento en la solubilidad aparente del fármaco en la fase acosa de la pomada mediante la formación de complejos de inclusión (Fromming y Szejtli, 1999).

Algunos autores han investigado la efectividad de los derivados de ciclodextrinas como promotores de la absorción. El efecto de soluciones de 2-hidroxipropil- β -CD sobre la permeabilidad del estradiol a través de piel de ratón fue mucho mayor que la que presentaba en una solución de propilenglicol y ácido oleico. Además, se ha estudiado el efecto de la β -CD sobre la absorción percutánea del tolnaftato, observándose un incremento de la concentración del fármaco en la piel y un aumento en la concentración en sangre en comparación con el control (Fromming y Szejtli, 1999).

Los estudios de absorción in vitro, a través de piel de ratón, han permitido evaluar la influencia en la absorción que ejerce la formación de complejos entre la dexametasona, empleada como modelo de fármaco, y β -CD e hidroxipropil- β -CD. Se ha observado un incremento en la permeabilidad del fármaco a través de la piel debido a la complejación con ciclodextrinas. (Lopez y cols., 2000).

Las lecitinas y el colesterol se pueden emplear, formando parte de una forma farmacéutica, como promotores de la absorción con el fin de modificar las propiedades de barrera y mejorar la absorción de fármacos que se administran a través de la piel.

La lecitina está constituida por una mezcla de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fitoglicolípidos, otros fosfátidos, carbohidratos, triglicéridos y otros componentes (Handbook, 1994). Mediante el empleo de las lecitinas, como promotores de la absorción, se ha logrado aumentar la permeabilidad de numerosos fármacos. Así, mediante el empleo de lecitinas de yema de huevo, lecitinas de soja comerciales (Epikuron o Capcithin), o mezclas de fosfatidilcolina y glicosilceramida incorporadas en distintas formulaciones (Kimura y cols., 1989; Willmann y cols., 1992; Bhatnagar y Vyas, 1994; Valenta y cols., 2000), se ha conseguido mejorar la absorción del diclofenaco, teofilina, dinitrato de isosorbide, broxaterol, escopolamina, ácido flufenámico, dextrometorfano, difenhidramina,

propanolol y ketoprofeno.

Al igual que las lecitinas, el colesterol se emplea como promotor de la absorción. Sin embargo, parece ser que este compuesto sólo aumenta la permeabilidad de moléculas hidrófilas debido a que el colesterol, incorporado en la formulación, penetra a través de la piel y se inserta entre las ceramidas (Brain y Walters, 1993). Para producir este efecto, el colesterol requiere más espacio que cualquier otra molécula ya que presenta un esqueleto esteroídico, rígido y plano. Los grupos polares del colesterol favorecen un incremento de la permeabilidad por su interacción con el agua. Parece ser que, desplaza a los grupos polares de las ceramidas incrementando el espacio de hidratación. Así, aumenta la solubilidad de las sustancias polares en estos dominios como consecuencia del efecto hidratante del colesterol. Se ha publicado que el colesterol, formando parte de microemulsiones, aumenta la permeabilidad de difenilhidramina (Schmalfuß y cols., 1997).

<i>Promotores de la absorción</i>	<i>Mecanismos de acción</i>
1. Solventes	
Agua	Hidratación, asociación con los grupos lipídicos, hinchamiento de la queratina.
Alcohol	
Cadena corta (C ₂ -C ₅)	Extracción lipídica (o hinchamiento).
Cadena larga (> C ₆)	Desintegración de la bicapa lipídica.
Azone®	Rotura de la bicapa lipídica.
Moléculas con grupo amida	Interacción lipídica.
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Extracción lipídica, pérdida de células córneas.
2. Tensioactivos	
Aniónicos	Interacción con proteínas.
Catiónicos	Unión con proteínas de la epidermis.
No-iónicos	Incremento en la fluidez de la membrana, solubilización y extracción lipídica.
3. Ácidos grasos y ésteres	
Ácido oleico	Interacción lipídica.
Miristato de isopropilo	Interacción lipídica.
4. Promotores biodegradables	
Ésteres de alquilo	Incrementa la fluidez de los lípidos.
Ureas cíclicas insaturadas	Interacción con los lípidos del estrato córneo.
Alquil N,N-dialquilaminoacetatos	Interacción con lípidos.
N-(2-hidroxietil)-2-pirrolidonas	Interacción con los lípidos de la piel.
Ácido ε-aminocaproico	Interacción con los lípidos de la piel.
5. Otros	
Terpenos	Rotura del dominio lipídico, incrementa de la partición del fármaco.
Colesterol	Interacción con grupos polares de las ceramidas.
Pirrolidonas	Hidratación de la piel, interacción con proteínas.
Compuestos de urea	Hidratación del estrato córneo, queratolisis.
Fosfolípidos	Propiedades de los tensioactivos.
Ciclodextrinas	Inclusión entre los componentes de la piel.

Tabla IV. *Promotores de la absorción de fármacos y posibles mecanismos de acción.*

- b) Incremento de la permeabilidad mediante métodos físicos: las principales

fuerzas físicas estudiadas por su capacidad de aumentar la permeabilidad de la piel son: la electricidad y los ultrasonidos. Una de estas técnicas utiliza la electricidad con el fin de incrementar la permeabilidad de la piel: iontoforesis; y la otra técnica emplea los ultrasonidos: fonoforesis o sonoforesis.

- *Iontoforesis*: es una técnica moderna basada en la aplicación de un campo eléctrico sobre la piel. Así, las moléculas de fármaco cargadas positiva y negativamente son repelidas por el electrodo con la misma polaridad (ánodo (+) y cátodo (-)) produciéndose el movimiento de las mismas hacia la piel y por lo tanto incrementando su permeabilidad.

La iontoforesis se caracteriza por ser una terapia no invasiva, y por ello ha tenido bastante aceptación en los distintos campos de la medicina. A parte de su aplicación en tratamientos a nivel tópico (Glass y cols., 1980; Singh y cols., 1993), la iontoforesis se está utilizando, frecuentemente, para obtener efectos a nivel sistémico. Además, permite controlar la cantidad cedida de fármaco que se administra a través de la piel. Esta técnica permite aumentar la permeabilidad de fármacos que se encuentran ionizados a pH fisiológico, que posean un tamaño molecular grande y que sean de naturaleza hidrófila. Las proteínas y los péptidos pertenecen a esta clase de moléculas. La iontoforesis ha resultado ser eficaz en incrementar la absorción a través de la piel de polipéptidos con carga (Meyer y cols., 1990). También, se ha empleado exitosamente con beta-bloqueantes como el propranolol y metoprolol (Kalia y cols., 1998).

- *Sonoforesis*: esta técnica se basa en la migración de las moléculas de fármaco a través de la piel intacta cuando son sometidas a perturbaciones ultrasónicas. El mecanismo por el que esta técnica aumenta la permeabilidad de los fármacos a través de la piel se desconoce todavía, a pesar, del uso frecuente de la sonoforesis en terapia clínica. Parece ser que el incremento de la permeabilidad se produce como resultado de alteraciones térmicas, mecánicas y químicas de los tejidos biológicos cuando son inducidos por ondas ultrasónicas (Tyle y Agrawala, 1989; Mitragotri y cols., 1995).

Esta técnica produce daño celular (Levy y cols., 1989) y además, afecta a la organización de la estructura lipídica del estrato córneo. También, produce fenómenos de oxidación, hidrólisis y despolimerización como consecuencia de la exposición a los ultrasonidos.

La fonoforesis se emplea, en tratamientos tópicos, para aumentar la permeabilidad de la piel a determinados fármacos. Se ha estudiado su capacidad para aumentar la permeabilidad de anestésicos (Hsu y cols., 1991), proteínas y péptidos (Tachibana, 1992) con el objetivo de alcanzar efectos sistémicos.

- *Incremento de la actividad termodinámica del fármaco*: se trata de un método físico que se emplea para aumentar la permeabilidad de las moléculas mediante el incremento de su actividad termodinámica. La actividad termodinámica de un fármaco, disuelto en un solvente o en un polímero, está relacionada con el tipo y el grado de interacción con el solvente o el polímero. Las interacciones fuertes están asociadas a baja actividad y las débiles a alta actividad. Algunas investigaciones pusieron de manifiesto la posibilidad de incrementar la actividad termodinámica del fármaco,

seleccionando los solventes adecuados en el vehículo para facilitar el transporte del fármaco hacia el estrato córneo (Higuchi, 1960; Poulsen y cols., 1978).

Por otra parte, se ha acentuado el interés por incrementar la actividad termodinámica de los fármacos en solución, empleando la supersaturación como fenómeno físico para aumentar la permeabilidad de un fármaco (Kondo y cols., 1987; Megrab y cols., 1995). En los primeros estudios realizados, basándose en el fenómeno de saturación, se emplearon sistemas de solventes constituidos por solventes volátiles y no volátiles y membranas artificiales. De esta manera se lograba incrementar el flujo de hidrocloruro de morfina a través de estas membranas por evaporación del solvente volátil. También, se ha conseguido aumentar el flujo del minoxidilo a través de piel humana en ensayos de cesión in vitro. (Chiang y cols., 1989).

Sin embargo, en todos estos estudios en los que se produce evaporación del solvente volátil, después del incremento en la absorción del fármaco a través de la membrana, se produce una disminución de dicha absorción debido a fenómenos de cristalización. Se ha logrado mejorar la absorción, desde estos sistemas de solventes, mediante la adición de polímeros que impiden la formación de cristales (Kondo y cols., 1987). Posteriormente, se han empleado mezclas binarias de propilenglicol/agua en diferentes porcentajes en presencia de un polímero antiagregante, dando lugar a las soluciones saturadas que aumentan la permeabilidad de hidrocloruro de morfina y piroxicam (Davis y Hadgraft, 1991; Megrab y cols., 1995).

2.5.2.- Empleo de formas farmacéuticas o/y dispositivos terapéuticos para mejorar la absorción transdérmica de fármacos

La absorción transdérmica de fármacos incorporados en una forma farmacéutica depende de dos procesos que ocurren consecutivamente: 1) liberación del fármaco desde la formulación y 2) absorción a través de la piel en el lugar de administración (Shima y cols., 1981). Por lo tanto, un incremento en la cesión del fármaco desde la formulación hacia la piel se traduce, normalmente, en un aumento en la absorción percutánea. La cantidad de fármaco cedida desde la formulación depende de las características físico-químicas del vehículo y el fármaco.

Algunas formas farmacéuticas mejoran o potencian la absorción de fármacos a través de la piel. Sin embargo, el efecto promotor que antiguamente se atribuía a las características de las formas farmacéuticas, en ocasiones, no se debe por completo a estas sino a excipientes concretos que se incorporan en estas formulaciones y que se comportan, simplemente, como promotores de la absorción (Irwin y cols., 1990; Liu y cols., 1992).

- **Pomadas:** este tipo de formulaciones permite la incorporación de diferentes fármacos y su posterior cesión desde el vehículo hacia la superficie de la piel con el fin de absorberse a través de la misma. La base que forma parte de las pomadas constituye un factor importante en la cesión y absorción de los fármacos.

Estudios previos realizados en humanos han aportado información sobre la influencia de la naturaleza físico-química del vehículo en el cual el fármaco es formulado para que pueda absorberse a través de la piel. Estos estudios han sugerido que la formulación de pomadas se puede ajustar con el fin de optimizar la absorción de los fármacos (Realdon y cols., 1996).

Para demostrar lo expuesto anteriormente, se ha seleccionado como base una emulsión de tipo o/a para estudiar el efecto del tensioactivo sobre la cesión de distintos fármacos. Se ha comprobado que un incremento en la concentración del tensioactivo aumenta la cesión de los fármacos. Este fenómeno ya ha sido observado por otros autores con fármacos incorporados en pomadas (Ezzedeen, 1990). Además, un incremento en la concentración del fármaco favorece su cesión desde este tipo de formulaciones.

Otros autores han utilizado otro tipo de bases constituidas por ácidos grasos de propilenglicol (Lin y cols., 1996), polietilenglicol, eutanol y glicerol (Realdon y cols., 1996), lográndose en todas las formulaciones un aumento de la cesión del fármaco y por lo tanto de su absorción. La mayor o menor cesión de un mismo fármaco formulado en diferentes bases dependerá del coeficiente de reparto aceite/agua, ya que es el responsable de las interacciones físicas entre fármaco y excipiente.

La incorporación del ácido bifenilacético a una pomada hidrófila formando complejos con ciclodextrinas ha mejorado la cesión y la absorción de este compuesto. El incremento en la cesión y absorción del ácido bifenilacético, se debe a un aumento de su solubilidad en el vehículo como consecuencia de la formación de complejos del fármaco con ciclodextrinas (Arima y cols., 1996).

- *Emulsiones*: las emulsiones son sistemas dispersos de dos fases inmiscibles donde la fase interna y la externa son líquidas. El tamaño de la fase interna varía entre 0,5 y 100 μm . Las emulsiones pueden ser oleo-acuosas (o/a) o acuo-oleosas (a/o). También, hay que destacar la existencia de las emulsiones múltiples constituidas por tres fases, pudiendo ser oleo-acuo-oleosas (o/a/o) o acuo-oleo-oleosas (a/o/a).

Las emulsiones destinadas para uso externo se clasifican en función de la forma farmacéutica en linimentos, lociones, cremas y otros preparados. Las emulsiones dermatológicas para uso externo constituyen el grupo más importante de las emulsiones utilizadas en farmacia y medicina. Ambos tipos de emulsiones o/a y a/o se utilizan frecuentemente por sus propiedades terapéuticas y como vehículos para la absorción de fármacos a través de la piel. Este tipo de formulaciones presenta gran interés debido a la gran aceptación por parte del paciente. La consistencia puede variar considerablemente desde preparados líquidos (lociones y linimentos) hasta preparados semisólidos (pomadas y cremas). Las emulsiones o/a se caracterizan por extenderse fácilmente sobre la piel, mezclarse bien con los exudados y eliminarse sin ningún tipo de problema del lugar de administración. Las emulsiones a/o presentan la capacidad de hidratar la piel por oclusión, constituyendo un factor importante en la absorción de fármacos.

Numerosos estudios han demostrado que los fármacos incorporados en emulsiones son capaces de absorberse a través de la piel en mayor extensión que las

forma tópicas habitualmente empleadas. Estas formulaciones han logrado aumentar la permeabilidad de fármacos anti-inflamatorios esteroídicos y no esteroídicos, anestésicos y antipsicóticos (Schawartz y cols., 1995).

Las emulsiones múltiples se caracterizan por presentar un gran número de aplicaciones debido a su capacidad de incorporar moléculas lipófilas o hidrófilas en función de que la emulsión sea o/a/o o a/o/a, respectivamente. Este tipo de emulsiones puede constituir sistemas potenciales para controlar la liberación de diferentes fármacos. Se han realizado estudios in vitro, que confirman la eficacia de las emulsiones múltiples como sistemas que controlan la cesión y favorecen la absorción de fármacos lipófilos e hidrófilos a través de la piel (Mishra y Pandit, 1990; Ferreira y cols., 1995; Sela y cols., 1995).

- *Geles*: son muy utilizados como vehículos dermatológicos. Los oleogeles, hidrogeles y geles constituidos por agua, aceite y uno o más tensioactivos se emplean frecuentemente en cosmética y para la incorporación de fármacos, con el fin de aumentar su permeabilidad a través de la piel y así alcanzar efectos sistémicos (De Vos y cols., 1991).

En este tipo formulaciones es frecuente el empleo de cosolventes, tensioactivos y solventes orgánicos que actúan por un lado formando parte del vehículo y por otro como promotores de la absorción de los fármacos administrados (Chiang y cols., 1989; Irwin y cols., 1990; Nishihata y cols., 1990; Liu y cols., 1992).

La mayoría de los geles empleados como vehículos para incrementar la permeabilidad del estrato córneo a los fármacos incorporados en estas formulaciones son hidrogeles, en los que se han incorporado distintos fármacos como indometacina (Nishihata y cols., 1990; Miyazaki y cols., 1995), diclofenaco sódico (Ho y cols., 1994), oestradiol (Vermiere y cols., 1996) y ketoprofeno (Shah y cols., 1996).

También se han formulado geles que actúan como vehículos capaces de facilitar la solubilización del fármaco y favorecer la cesión del mismo desde la formulación hacia la piel. El resultado final es una mejora de la absorción del fármaco (Santoyo y cols., 1996).

- *Liposomas*: se caracterizan por ser de gran interés como sistemas de liberación de fármacos. Sus principales propiedades son la biocompatibilidad y biodegradabilidad. Ocasionalmente, los liposomas son capaces de actuar como sistemas de liberación controlada de fármacos (Masini y cols., 1993) y de interaccionar con células (endocitosis). Los liposomas, también, se emplean como sistemas de administración de fármacos a través de la piel (Komatsu y cols., 1986).

Los resultados contradictorios obtenidos en distintos estudios no permiten esclarecer los factores que influyen en la interacción de los liposomas con la piel. Estos factores desempeñan un papel muy importante en la eficacia del transporte de fármacos a través de la piel. Los estudios de cesión in vitro con piel humana han permitido esclarecer los dos tipos de interacciones que se producen entre la piel y los liposomas (Vora, y cols., 1998). Estas interacciones son: 1) los liposomas en contacto con la piel

se agregan, funden y se adhieren a la superficie de la célula. Esta interacción parece que provoca un elevado gradiente de la actividad termodinámica del fármaco en la interfaz, existente entre el liposoma y el estrato córneo, que es la fuerza responsable para que los fármacos lipófilos atraviesen el estrato córneo; 2) este tipo de interacción da lugar a cambios ultraestructurales de las regiones lipídicas intercelulares del estrato córneo y sus capas más profundas. Además, en la interacción entre los liposomas y la piel intervienen una serie de factores como la deshidratación del liposoma, naturaleza del fármaco, tamaño y composición del liposoma y factores biofísicos (Vora, y cols., 1998).

Se ha demostrado la eficacia de este tipo de formulaciones como sistemas portadores y promotores de la absorción de diferentes fármacos como el ketoprofeno (Valenta y cols., 2000) y diclofenaco sódico (Calpeana y cols., 1999). Este efecto promotor puede incrementarse cuando se incorporan en la formulación tensioactivos no iónicos (El Maghrabi y cols., 2000).

- *Microemulsiones*: estas formulaciones presentan una serie de ventajas con respecto a las formulaciones anteriormente mencionadas: 1) son termodinámicamente estables por lo que las propiedades de la formulación no dependen de las condiciones empleadas durante el proceso; 2) una vez formadas es muy difícil la aparición de fenómenos de separación de fases; 3) funcionan como "supersolventes" para determinados fármacos, pudiendo incrementar notablemente su solubilidad (Gasco y cols., 1991).

En determinados casos se han observado interacciones entre el fármaco y los componentes de la microemulsión. Concretamente, la doxorrubicina forma complejos lipófilos con los tensioactivos de una microemulsión o/a, incrementando el efecto reservorio del fármaco en la fase oleosa y haciendo más lenta la difusión del fármaco a la fase acuosa (Eccleston 1994).

Se ha estudiado el efecto potencial que presentan las microemulsiones para actuar como sistemas de liberación sostenida de fármacos administrados a través de la piel. Con el fin de estudiar la utilidad de estas formulaciones, se han incorporado fármacos de diferente lipofilia como el propranolol, felodipino y nortriptilina en la fase interna de microemulsiones o/a y a/o (Trotta y cols., 1997; Ktistis y Niopas., 1998; Moreno y cols., 2000).

- *Parches transdérmicos*: son de aplicación tópica y actúan de soporte de principios activos con acción sistémica, permitiendo una cesión prolongada de los mismos. Están constituidos por: 1) un módulo de liberación constituido generalmente por material polimérico, y consta de un depósito de principio activo y un sistema que controla la cesión; 2) sistema afianzador que es un adhesivo hipoalergénico que se encuentra en contacto con la piel; 3) envase, formado por dos láminas impermeables y flexibles herméticamente selladas, rodeando completamente al sistema. Este tipo de sistemas se clasifican en tres grupos: sistema de depósito y reservorio, sistema matricial y sistema mixto.

Entre los principios activos incorporados a este tipo de formulaciones que se encuentran comercializadas destacan la nitroglicerina, administrada una vez al día para

el tratamiento de la angina de pecho (Transderm-Nitro[®]); estradiol, administrado dos veces por semana para el alivio de los síntomas premenopausicos (Estraderm[®]); nicotina, administrada cada 16 horas como tratamiento coadyuvante a un programa de deshabituamiento de fumadores (Nicotrans[®]); clonidina, administrada una vez a la semana para la hipertensión (Catapress-TTS[®]) y el nitrendipino que se encuentran en fase de experimentación (Theeuwes, y cols, 1991; Ruan y cols., 1992; Walters, 1995).

2.6.- Cinéticas de absorción.

En el proceso de absorción percutánea, el fármaco depositado en la superficie de la piel atraviesa el estrato córneo, la epidermis viable, la dermis y finalmente llega al torrente circulatorio. La entrada al sistema circulatorio se produce a distintos niveles de la dermis, debido a la distribución heterogénea de los vasos que la constituyen.

Aunque la absorción percutánea es un proceso con varias etapas, la resistencia a la absorción a través de esta barrera no está igualmente distribuida en todas las capas que la constituyen. Numerosos estudios han demostrado que, en la mayoría de los fármacos, el paso a través del estrato córneo constituye la etapa limitante (Franz y Lehman, 1995). Las cinéticas de absorción de fármacos a través de la piel se pueden entender, si se consideran y comprenden las cinéticas de movimiento de los fármacos a través del estrato córneo.

2.6.1.- Dosis finitas

En primer lugar debe establecerse, de forma clara, la diferencia entre la administración tópica de fármacos que tiene como objetivo obtener efectos terapéuticos en el lugar de aplicación, y la administración transdérmica de fármacos que tiene como fin obtener efectos terapéuticos en lugares distantes del lugar de aplicación.

La mayoría de las formas farmacéuticas de administración tópica, a excepción de los sistemas transdérmicos, se administran sobre la piel en pequeñas dosis. Así, para cremas y pomadas la cantidad de formulación administrada es de 2-3 mg/cm² siendo únicamente la cantidad de fármaco presente de microgramos, a esto se le denomina dosis finita. Generalmente, en este tipo de formulaciones los excipientes se volatilizan o se absorben a través de la piel a los pocos minutos de la administración de la forma farmacéutica, no apreciándose ninguna evidencia de su aplicación. El fármaco se localizará en alguna de las capas microscópicas superficiales que constituyen el estrato córneo.

La ecuación que define la difusión para una dosis finita es la siguiente:

$$J = 2lpDC_0 \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\alpha_n e^{-D\alpha_n^2 t}}{\text{sen } \alpha_n h [h(\alpha_n^2 + l^2) + l]}$$

$$\alpha_n = (\alpha h \tan \alpha h)^{1/2} = lh$$

$$l = \frac{\rho}{v}$$

donde:

J = velocidad de absorción.

D = coeficiente de difusión.

C_0 = concentración a $t = 0$.

ρ = coeficiente de partición.

v = espesor de la formulación administrada.

h = espesor del estrato córneo.

n = número de partículas libres

El flujo de un fármaco administrado a dosis finita desde la superficie de la piel hacia la epidermis y posteriormente hacia el sistema circulatorio sigue el modelo mostrado en la figura 7A.

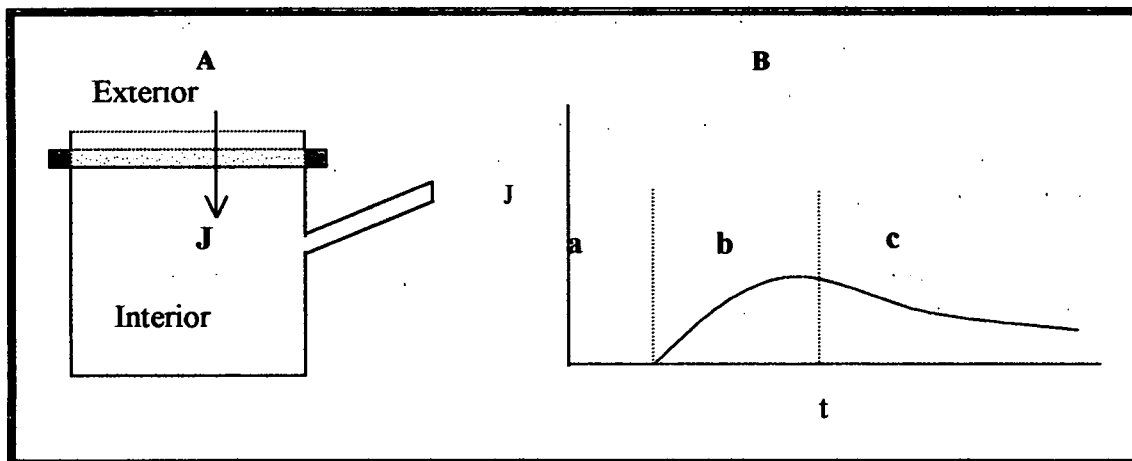


Figura 7. A) Dibujo esquemático que representa la administración de una forma farmacéutica con dosis finita sobre una celda de difusión in vitro en la que se ha utilizado como membrana piel. B) Flujo teórico del fármaco desde la formulación hacia el interior del fluido del compartimento receptor.

El proceso se puede dividir en tres etapas como se indica en la figura 7B:

1. Etapa de latencia. Se caracteriza por un periodo inicial donde no se produce absorción. Posteriormente, el fármaco difunde desde la formulación administrada hacia el estrato córneo pero sin atravesar todo su espesor, por lo que no se produce la entrada al torrente circulatorio (in vivo) o al fluido que forma parte del compartimento receptor (in vitro). Existe un aumento significativo de la difusión del fármaco en la interfaz constituida entre la formulación y el estrato córneo. Debido a este fenómeno, la cantidad de fármaco depositada en la piel se absorbe en elevado porcentaje a los pocos minutos. No obstante, el fármaco no alcanza las capas más profundas que constituyen la piel, siendo el flujo nulo. Con el paso del tiempo aumenta la cantidad de fármaco que desaparece desde la superficie de la piel y el flujo continúa siendo nulo. Finalmente, se

produce un aumento de la concentración del fármaco en la piel, y su concentración es mayor en las capas externas que en las internas. La concentración del fármaco en las capas internas de la piel constituye la fuerza que origina el flujo hacia los tejidos más profundos, y el tiempo invertido durante este proceso será exactamente igual al tiempo necesario para que se detecte el flujo.

2. Fase ascendente. A medida que aumenta el tiempo, el fármaco es capaz de atravesar todo el espesor del estrato córneo para absorberse posteriormente en la epidermis y dermis hasta llegar a los capilares. De esta manera se pueden determinar las concentraciones del fármaco a nivel plasmático en estudios *in vivo*, o a nivel del fluido receptor en ensayos *in vitro*. Mientras tanto, aumenta la cantidad de fármaco en las capas más profundas de la piel debido a su aporte desde la superficie, e incrementa la velocidad del flujo desde estas capas a capas más internas y al torrente circulatorio.

Todo esto se traduce en un incremento de la pendiente en la porción lineal, del perfil obtenido al representar el flujo frente al tiempo (Figura 7B).

3. Fase descendente. Obviamente, la difusión del fármaco desde el lugar de administración hacia el estrato córneo no puede continuar indefinidamente ya que la dosis administrada es finita. El aporte continuo del fármaco que se absorbe desde la superficie a través de la piel se interrumpe. En condiciones de dosis finita, un fármaco presenta su máxima concentración en el momento de su administración, disminuyendo, posteriormente, la concentración con el tiempo. El tramo descendente de la curva (Figura 7B) refleja una disminución de la concentración del fármaco en el estrato córneo y por lo tanto un descenso de la concentración en la superficie de la piel. El descenso en la curva de absorción se origina porque no se puede mantener el flujo que se produce hacia el compartimento receptor (*in vitro*) o hacia el torrente circulatorio (*in vivo*) con el flujo existente en el interior de los tejidos que constituyen la piel.

2.6.2.- Dosis infinitas

La absorción percutánea de fármacos se caracteriza principalmente por la administración de dosis finitas, originándose un fenómeno de estado no-estacionario, donde el flujo aumenta hasta alcanzar un máximo y posteriormente disminuye. Este tipo de situación es la más parecida a la que se puede producir en la administración clínica de fármacos.

Sin embargo, la administración de dosis infinitas, con el fin de obtener una velocidad de absorción constante, se emplea frecuentemente en los laboratorios como herramienta de investigación. Además, ofrece una serie de ventajas entre las que se encuentran la simplicidad.

El empleo de dosis infinitas ha constituido durante mucho tiempo la propuesta predominante en el estudio de la permeabilidad de las membranas y también en el campo de la absorción percutánea. La cantidad de fármaco administrada sobre la piel constituye el principal factor para determinar la absorción de cinéticas estacionarias o no-estacionarias durante el proceso de absorción. En teoría, cuando se administran dosis

finitas, la cantidad de fármaco se absorbe hasta un determinado momento dando lugar a una cinética no estacionaria. Con el tiempo no habrá más cantidad de fármaco que pueda absorberse, y la cinética corresponderá a la mostrada en la figura 7B. Sin embargo, si la dosis es infinita se produce una velocidad de absorción constante (Figura 8).

Los fármacos con muy baja permeabilidad constituyen una excepción, ya que incluso la aplicación de una pequeña dosis da lugar a una velocidad de absorción constante.

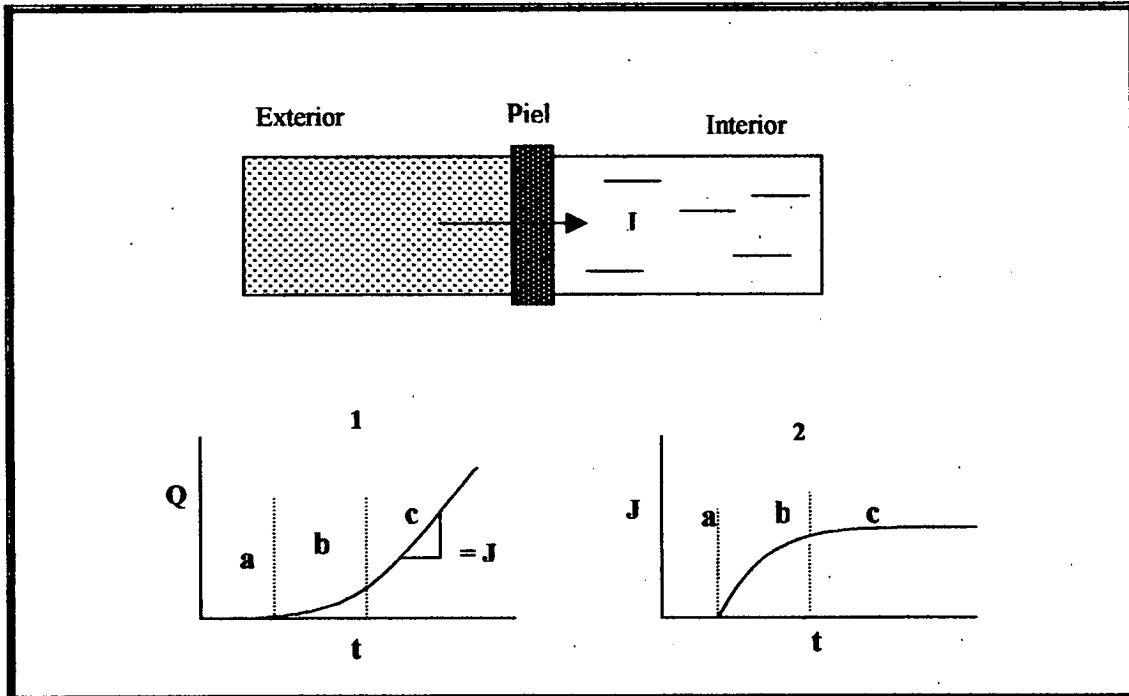


Figura 8. Representación esquemática de una celda de difusión in vitro "side by side" con aplicación de dosis infinita. Representación gráfica del experimento: 1. Cantidad acumulada de fármaco en el compartimento receptor frente al tiempo, 2. Velocidad de absorción hacia el compartimento receptor frente al tiempo.

Las ecuaciones que describen la velocidad de absorción en el estado estacionario se obtienen a partir del desarrollo matemático de la 1ª ley de Fick. La primera ley de Fick de difusión considera el flujo como la cantidad de fármaco (M) que atraviesa la sección (S) de la barrera, por unidad de área, en la unidad de tiempo (t).

Ecuación 1:

$$J = -D \frac{\partial C}{\partial x}$$

donde:

- M = masa (g)
- S = superficie de la membrana (cm^2)
- t = tiempo (s)
- J = flujo (moles ó $\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{seg}$)

El flujo es proporcional al gradiente de concentración que atraviesa la sección:

Ecuación 2:

$$J = \frac{\delta M}{S \delta t}$$

donde:

C = concentración de fármaco que difunde (g/cm^3).

x = distancia (cm), medida perpendicularmente a la barrera.

D = coeficiente de difusión o difusividad de la sustancia que se absorbe (cm^2/s).

Matemáticamente, el signo negativo significa que el flujo se produce hacia la zona de menor concentración. El coeficiente de difusión (D) no siempre permanece constante. Se ve afectado por la temperatura, presión, las propiedades del solvente y la naturaleza química y concentración del medicamento que difunde.

Además, al no ser la membrana biológica uniforme en todos sus puntos (presenta poros de distinto tamaño), tener distinto espesor y, probablemente, composición variable, D y x variarán de un lugar a otro, por eso es mejor considerar el valor medio de los mismos.

Para conocer el cambio que sufre la concentración de fármaco que se absorbe en un punto de la membrana utilizaremos la 2ª ley de Fick. Esta ley es la afirmación matemática fundamental de la difusión y se puede aplicar en la mayoría de las situaciones experimentales. La concentración de las moléculas que difunden en un volumen determinado, cambia con el tiempo ($\delta c / \delta t$), así como el flujo de la cantidad difundida cambia con la distancia ($\delta J / \delta x$, en la dirección x):

Ecuación 3:

$$\frac{\delta c}{\delta t} = - \frac{\delta J}{\delta x}$$

Diferenciando la ecuación 2 con respecto a x , se obtiene:

$$- \frac{\delta J}{\delta x} = D \frac{\delta^2 c}{\delta x^2}$$

Ecuación 4:

Al sustituir $\delta c / \delta t$ de la ecuación 2 en la ecuación 3 se obtiene la segunda ley de Fick que expresa la difusión sólo en una dirección, x :

Ecuación 5:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2}$$

Esta expresión matemática establece que la velocidad con que cambia la concentración con el tiempo en un punto dentro de un campo difusional es proporcional a la velocidad con que cambia el gradiente de concentración en ese punto.

La solución de la 2ª ley de Fick bajo situaciones experimentales unidimensionales, como es el caso de los estudios de absorción percutánea in vitro, donde el incremento en la concentración se mantiene constante durante todo el ensayo (asumiendo que la dosis es infinita) y el compartimento receptor mantiene condiciones "sink" (compartimento receptor se mantiene a concentración cero) viene dada por la siguiente ecuación:

Ecuación 6:

$$C = C_0 \frac{x}{h} + \frac{2}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{C_0}{n} \cos(n\pi) \sin\left(\frac{n\pi x}{h}\right) e^{-n^2 \pi^2 D t / h^2}$$

donde:

C_0 = concentración a tiempo cero (se asume que es constante).

Las condiciones limitantes que se establecen son:

- $C = C_0$ a $x = 0$ (superficie en contacto con el fármaco que difunde). Se asume que esta condición es verdadera durante toda la duración del ensayo.
- $C = 0$ para todo $x > 0$ y $t = 0$. Al inicio del experimento el fármaco que difunde se localiza en la superficie.
- $C = 0$ para $x = h$ y para todo t . Se asume que la concentración del fármaco que difunde, en la superficie de la membrana que esta en contacto con el fluido receptor es cero.

La ecuación 6 nos permite calcular la cantidad acumulada de fármaco que difunde por unidad de área (Q) que pasa a través de la membrana en un tiempo t , dando lugar a la siguiente ecuación:

Ecuación 7:

$$Q = \frac{DC_0 t}{h} - \frac{hC_0}{6} - \frac{2hC_0}{\pi^2} \cdot \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n^2} e^{-n^2 \pi^2 D t / h^2}$$

Para $t \rightarrow \infty$, la ecuación 7 se aproxima a una línea recta que viene dada por la siguiente ecuación:

Ecuación 8:

$$Q = \frac{DC_0}{h} \left(t - \frac{h^2}{6D} \right)$$

La ecuación 8 refleja la situación donde la difusión ha alcanzado el estado estacionario, es decir, la cantidad que se absorbe por unidad de área es constante. El flujo en el estado estacionario viene dado por:

Ecuación 9:

$$J = \frac{dQ}{dt} = \frac{DC_0}{h}$$

En esta ecuación la pendiente correspondiente a la representación gráfica de Q frente al t , después de alcanzar el estado estacionario será igual a J . Si extrapolamos la recta originada en el estado estacionario al eje de abscisas, obtenemos el siguiente valor de t_l :

Ecuación 10:

$$t_l = \frac{h^2}{6D}$$

Al valor de t_l obtenido, por extrapolación de la recta con el eje de abscisas, se le denomina "lag time" o tiempo de latencia. A partir de t_l se puede calcular el coeficiente de difusión (D) conociendo el espesor de la membrana.

Ecuación 11:

$$D = \frac{h^2}{6t_l}$$

El "lag time" o tiempo de latencia junto con el flujo en el estado estacionario, nos permite estimar todas las demás variables que controlan el proceso de difusión.

En la mayoría de los ensayos de difusión, se mide la concentración en el compartimento donador C_0 , que se encuentra en contacto con la membrana. Sin embargo, la concentración existente en la primera capa que constituye la membrana, C_o , se puede calcular si se conoce el coeficiente de difusión del fármaco que difunde entre el compartimento donador y la membrana. Estas dos concentraciones se encuentran relacionadas entre sí:

Ecuación 12:

$$C_o = C_0 \cdot K$$

donde K es el coeficiente de reparto entre la membrana y el compartimento donador.

Por consiguiente, el flujo en el estado estacionario se puede obtener a partir de la siguiente ecuación:

Ecuación 13:

$$J = \frac{dQ}{dt} = \frac{DC_0'K}{h}$$

En la figura 9 se representa esquemáticamente el procedimiento de evaluación del proceso de absorción para una dosis infinita.

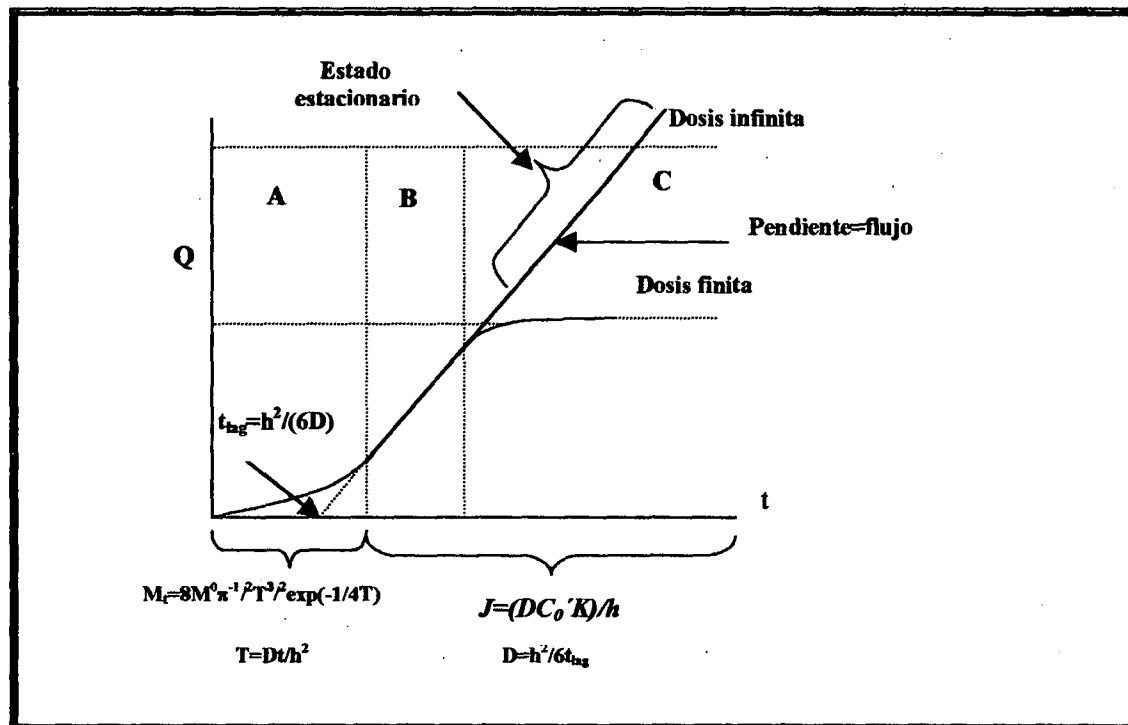


Figura 9. Diagrama para la evaluación de la absorción percutánea de fármacos mediante la administración de dosis infinitas (sistemas de administración transdérmicos) o dosis finitas (pomadas). A. estado de transición. B. Estado pseudo-estacionario. C. Estado estacionario M_t = cantidad absorbida a un determinado t. M^0 = cantidad total de fármaco en el compartimento donador. T = tiempo normalizado. t_{lag} = periodo de latencia. D = coeficiente de difusión. h = espesor de la piel. C_0 = concentración en el compartimento donador. J = flujo en el estado estacionario. K = coeficiente de partición piel / vehículo.

Debido a la dificultad inherente en la determinación del coeficiente de reparto del fármaco entre el compartimento donador y el estrato córneo, el proceso de absorción percutánea se ha evaluado mediante el coeficiente de permeabilidad (K_p):

Ecuación 14:

$$K_p = \frac{DP}{h}$$

A partir de K_p se puede calcular el flujo, velocidad con que se absorbe el fármaco en el estado estacionario, mediante la siguiente ecuación (Franz y Lehman, 1995):

Ecuación 15:

$$J = K_p C$$

Es importante destacar que durante todo el desarrollo matemático se ha considerado la difusión a través de una membrana unilaminar e isotrópica. Sin embargo, la piel es un tejido complejo y este modelo matemático no es del todo adecuado para describir el proceso de absorción percutánea. Para poder explicar de una manera más detallada el proceso de absorción a través de la piel, Scheuplein y Blank (1971) consideraron la piel como una membrana constituida por tres capas (estrato córneo, dermis y epidermis), a través de las cuales el fármaco difundía según la ley de Fick, y alcanzaba el equilibrio de reparto en los límites que separan las diferentes capas. Teniendo en cuenta todas estas consideraciones, el flujo a través de la piel se expresa mediante la siguiente ecuación:

Ecuación 16:

$$J_0 = \frac{1}{\frac{1}{J_1} + \frac{1}{J_2} + \frac{1}{J_3}}$$

donde los subíndices 1, 2 y 3 hacen referencia a cada una de las capas que constituyen la membrana y el subíndice 0 hace referencia a la membrana en su totalidad. Debido a que el estrato córneo ofrece mayor resistencia al paso de moléculas a la capa 1 que a la dermis y epidermis, la ecuación 16 queda reducida a la siguiente expresión:

$$J_0 = J_1$$

La determinación de la permeabilidad en la piel puede considerarse para propósitos prácticos, como la permeabilidad que se obtiene a través de la capa que controla el proceso de absorción. El estrato córneo presenta mayor propiedad de barrera que el resto de las capas (dermis y epidermis) y, por lo tanto, controla el proceso de absorción a través de toda la piel. Esta observación ha llevado a muchos investigadores a emplear el estrato córneo como modelo para estudios de absorción percutánea.

Mediante el estudio de las características fisiológicas de las células epidermales que constituyen el estrato córneo, se ha podido comprobar que este es capaz de absorber una cantidad de agua correspondiente a seis veces su peso en estado seco, sin que se produzca un incremento excesivo en su permeabilidad. Sin embargo, la extracción de lípidos que constituyen el estrato córneo provoca un aumento considerable de la permeabilidad de consecuencia irreversibles. Estas observaciones llevaron a algunos autores (Ritschel y Hussain, 1988) a postular que el estrato córneo está constituido por agrupaciones paralelas de láminas delgadas constituidas por proteínas que están separadas entre sí por delgadas capas de material lipídico intersticial. Según este modelo, la parte lipídica intersticial es la fase continua de la matriz mientras que, la parte proteica constituye la fase discontinua. Este modelo asume que la capa proteica y

Para cualquier molécula, solo existen dos rutas de absorción a través del estrato córneo: 1) difusión a través de las fases proteicas y lipídicas, 2) difusión a través de la fase continua lipídica. Las distintas moléculas que difunden dentro de cada fase presentan características determinadas de solubilidad y difusividad. Según estas consideraciones, el flujo a través del estrato córneo se puede determinar a partir de la siguiente ecuación:

Ecuación 17:

$$J = 0,135P \frac{D_L}{D_P} \left(\frac{1,16 + 0,0017(PD_L / D_P)}{0,16 + (PD_L / D_P)} \right) C_w$$

donde:

D_L/D_P : relación de difusividad de la molécula que se absorbe entre la fase lipídica y la fase proteica. Tiene el valor empírico de $2,0 \times 10^{-3}$.

P : coeficiente de reparto lípido / proteína. Se considera igual al coeficiente de reparto aceite / agua.

2.7.- Métodos para la determinación de la absorción percutánea in vivo

La mayoría de los estudios de absorción percutánea emplean animales o modelos in vitro. Lo que se busca con este tipo de estudios es que los resultados obtenidos se puedan extrapolar al ser humano y a situaciones clínicas. Sin embargo, muchos de los resultados que se pretenden conseguir solo se pueden obtener con la experimentación en humanos.

A pesar de que los diseños experimentales en humanos están bastantes limitados, debido a consideraciones éticas y limitaciones reguladoras, los resultados obtenidos suelen ser relevantes y no están sujetos a errores de extrapolación. De hecho, si se combinan los resultados conseguidos, mediante un diseño adecuado in vitro o con animales de experimentación con los resultados de estudios in vivo, se confirman los estudios anteriores dando lugar a un mayor entendimiento del comportamiento del fármaco y del proceso de absorción.

2.7.1- Método de excreción urinaria.

Los primeros estudios realizados para la aplicación de este método se basaron en la administración sobre la piel de compuestos marcados con radioisótopos y la posterior determinación de la radioactividad en orina (Feldman y Maibach, 1970). Otros investigadores han realizado numerosas modificaciones de esta técnica, con el fin de mejorar la formulación empleada en este método y las condiciones de aplicación. No obstante, los principales fundamentos de estos primeros estudios se han mantenido.

En el protocolo diseñado por Feldmann y Mainbach (1970), los fármacos objeto de estudio eran disueltos en acetona, con un área de aplicación definida para cada compuesto y una dosis constante. El área de aplicación se determinaba teniendo en

compuesto y una dosis constante. El área de aplicación se determinaba teniendo en cuenta tres factores: 1) la actividad del compuesto sometido a estudio, 2) la dosis radioactiva, 3) la dosis del fármaco.

Por otra parte, los compuestos que poseían baja actividad específica requerían grandes zonas de aplicación para alcanzar la dosis radioactiva deseada. Por el contrario, los compuestos con alta actividad específica debían ser diluidos, pero sin exceder la dosis radioactiva deseada.

Para normalizar la dosis excretada a partir de las distintas rutas de administración, se administró una dosis del mismo compuesto por vía intravenosa (i.v.). La determinación de la fracción de una dosis intravenosa excretada en orina permite calcular la dosis total absorbida, después de una dosis administrada por vía transdérmica según la siguiente ecuación:

$$\text{Absorción total} = \frac{\text{Excreción total urinaria (dosis transdérmica)}}{\text{Fracción urinaria excretada (dosis i.v.)}}$$

Esta técnica se basa en la suposición de que la relación entre las rutas de excreción después de la aplicación de una dosis intravenosa es la misma que tras la administración percutánea del fármaco, a través de la cual se consigue un efecto sistémico. Esta suposición no es del todo cierta, puesto que, no se puede asumir que toda la dosis administrada a través de la piel pase al torrente circulatorio de forma inalterada como ocurre en la vía i.v. Esto es debido a que la piel presenta actividad metabólica significativa, como se ha observado en numerosos estudios que han demostrado la existencia de procesos simultáneos de absorción y metabolismo de los fármacos administrados (Bronaugh y cols., 1982). Por lo tanto, es necesario un estudio más profundo de este método para que se pueda aplicar de manera fiable.

Para la correcta utilización de este método, es necesario tener en cuenta una serie de factores: el área de la zona de administración, la cantidad de dosis administrada, tiempo de administración, tiempo de toma de muestra y determinación en heces. Debido a que todos estos factores pueden influir considerablemente en los resultados obtenidos, la falta de consideración de los mismos puede llevar a resultados erróneos o a que no se puedan aplicar directamente a situaciones clínicas.

- **Zona de administración:** como se ha comentado anterior, existe una gran variabilidad en la absorción del fármaco según el lugar de administración. Determinadas áreas necesitan una mención especial ya que presentan mayor hidratación, dando lugar a un incremento en la absorción. El antebrazo constituye una de las zonas de administración más utilizadas, debido a que facilita el diseño, aplicación y control de los sistemas administrados. Esta zona presenta el inconveniente de presentar un área de aplicación relativamente pequeña. Cuando se necesitan áreas más grandes es necesario aplicar grandes cantidades de fármaco para su determinación a nivel sanguíneo. El tronco sería la siguiente zona de elección en la administración de fármacos.

- Administración múltiple: debido a que determinadas formulaciones requieren de su administración múltiple, es importante determinar si éstas provocan cambios en la absorción. Esto constituye un factor crítico cuando la administración crónica de una formulación altera o daña la piel.

Se han realizado numerosos estudios con el fin de determinar si la administración repetida de un fármaco modifica la absorción, pero en ninguno de estos estudios se han observado cambios en la misma. No obstante, el número de fármacos ensayados hasta hora no es lo suficientemente grande como para permitir extrapolar, de forma fiable, los resultados obtenidos a otros fármacos.

- Concentración del fármaco en la formulación: debido a que la absorción percutánea obedece a la ley de Fick, la concentración del fármaco en la formulación merece una especial consideración. Para que los datos sean significativos, la concentración de fármaco empleada debe ser similar a la empleada posteriormente a nivel clínico. En el caso de formulaciones comerciales, la concentración normalmente se mantiene constante y no sufre variaciones experimentales. Sin embargo, la dosis de fármaco administrada también constituye un factor importante a tener en cuenta. Aunque la concentración del fármaco suele ser constante, la cantidad de fármaco administrado sobre la piel ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) está en función de la cantidad de formulación que se administra. Sólo se pueden obtener datos relevantes cuando la dosis empleada se aproxima a la administrada a nivel clínico.

No obstante, en el diseño de un protocolo se utilizan grandes cantidades de formulación ya que facilitan el método analítico y se consigue una mayor exactitud en los datos. Esto constituye un gran error puesto que la cantidad total absorbida y la velocidad de absorción dependen de la cantidad de formulación administrada, dando lugar a una sobrestimación de la cantidad total absorbida, velocidad máxima de flujo y concentración máxima en sangre.

- Tiempo de administración: la mayoría de los fármacos administrados por vía tópica se absorben muy poco a través de la piel. En muchos casos, incluso después de muchas horas el fármaco continúa en la superficie de la piel sin absorberse.

Cuando se intentan repetir las condiciones que se emplean a nivel clínico, se debe tener en cuenta el tiempo que ha permanecido el fármaco sobre la superficie de la piel. Para muchas formas farmacéuticas, el tiempo de aplicación de la formulación está relacionado con la higiene diaria, siendo el tiempo razonable de 24 horas. En el caso de los productos cosméticos, el tiempo de administración suele ser de 8-12 horas.

- Tiempo de toma de muestra: en el caso de las muestras de orina, la toma debe realizarse cuando se detectan trazas de radioactividad en la misma. Generalmente, este tiempo suele estar comprendido entre 5-6 días. Cualquier error en la apreciación de este factor puede dar lugar a un grave error experimental en la determinación de la dosis absorbida (Feldmann y Mainbach, 1970).

Para aquellos fármacos que presenten una velocidad de excreción que conlleven a niveles bajos en orina, durante largos periodos de tiempo, se requieren dosis más altas

de radioactividad para que los tiempos de recogida sean lo suficientemente largos y permitan la toma de muestra. Esto requiere de una gran área de aplicación.

Otro factor a tener en cuenta es la frecuencia de la toma de muestra, generalmente en las primeras fases del experimento. Para aquellos fármacos que se absorben rápidamente se podrá conseguir una determinación exacta de las cinéticas de absorción, si las muestras de orina se recogen de manera frecuente durante las primeras etapas del experimento.

- Recogida de muestras fecales: la recogida de este tipo de muestras se debe incorporar dentro del protocolo cuando represente una considerable vía de excreción para el fármaco administrado. Los estudios previos en animales o en humanos nos permite conocer si la toma de muestras fecales es necesaria. Los datos obtenidos a partir de estas muestras tienen poco interés en la farmacocinética del fármaco administrado por vía transdérmica. En el caso de fármacos que se absorben poco a través de la piel y se excretan minoritariamente en heces no es necesario el análisis de muestras fecales.

Si el fármaco se excreta principalmente en heces, el factor de corrección por vía intravenosa será bastante grande y se producirá un gran error experimental en el cálculo de la cantidad total absorbida (Franz y Lehman, 1995). Por lo tanto, el análisis del fármaco a través de las heces será de vital importancia.

- Recogida de muestra en sangre: la determinación del fármaco en sangre constituye un componente esencial en los estudios farmacocinéticos de casi todas las vías de administración. No obstante, su utilidad en estudios de fármacos administrados por vía transdérmica representa un problema, debido a que la cantidad total de fármaco y la velocidad de absorción suelen ser bajas. En el caso de que los niveles de fármaco detectados en sangre sean bajos se emplearán fármacos marcados radioactivamente, siendo en estos casos el método de elección la determinación en orina.

Los métodos que se emplean para cuantificar el fármaco en sangre, administrado por vía transdérmica, deben ser muy sensibles. Entre los métodos analíticos empleados se encuentran el HPLC, cromatografía de gases y el radioinmunoensayo (Hamann y McAllister, 1983; Franz y Lehman, 1995).

2.7.2.- Método de balance de masas

La técnica de balance de masas constituye una modificación reciente del método de excreción urinaria. Esta técnica se puede emplear para todos tipo de compuestos administrados por vía tópica (Franz y Lehman, 1988).

Esta basado en algunos principios del protocolo original de Feldmann y Maibach (1970). En el antebrazo de los voluntarios se administran dosis de $4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de compuestos radiactivos. La absorción percutánea se determina a partir de la excreción en orina del compuesto radioactivo, corregida por la excreción tras su administración a través de otras rutas. La zona de aplicación se cubre con un dispositivo semi-rígido de polipropileno. La absorción se puede determinar bajo condiciones de oclusión

(dispositivo totalmente cerrado) o no oclusión (contacto con el medio externo a través de unos orificios realizados en el 50% de la superficie del dispositivo de propileno). El material empleado en la fabricación del dispositivo no retiene el agua transepidermal, por lo que no incrementa la hidratación del estrato córneo ni la absorción.

El dispositivo se reemplaza 24 horas después de la aplicación y se analiza la radioactividad retenida en el mismo. A continuación, se limpia el lugar de aplicación mediante un protocolo de lavado. Todo el material empleado en el proceso de lavado se analiza para determinar el contenido en radioactividad. El lugar de aplicación se cubre con un nuevo dispositivo durante seis días. Tras este periodo, el dispositivo se retira para analizar el contenido radioactivo siguiendo el protocolo de limpieza para el lugar de administración. A continuación se aplica una cinta adhesiva sobre la piel que se despega inmediatamente, repitiéndose este proceso diez veces. La cinta adhesiva se analiza para determinar el contenido en radioactividad.

Este método permite esclarecer cuales son las principales causas de pérdida del fármaco cuando se administra a través de la piel. Estas pérdidas se pueden deber a procesos de exfoliación, lavado y frotamiento de la zona de aplicación. Además, esta técnica permite recuperar la cantidad de fármaco retenido en el estrato córneo, una vez finalizado el experimento. Algunos autores han demostrado la validez de este método mediante la administración de distintos fármacos en seres humanos. Los datos obtenidos se compararon con los conseguidos por el método de excreción urinaria. La técnica de balance de masas permitió obtener un porcentaje de recuperación mayor de todos los fármacos ensayados con respecto al método de excreción urinaria (Franz y Lehman, 1988).

2.7.3.- Método basado en el desprendimiento de las capas que constituyen el estrato córneo ó "Stripping method"

La determinación de la cantidad de fármaco que se absorbe a través del estrato córneo mediante un proceso físico, basado en el desprendimiento de las capas individuales que constituyen el estrato córneo, representa el procedimiento más adecuado para predecir la absorción percutánea in vivo de un fármaco. La exactitud de esta técnica es independiente de los factores que normalmente influyen en la absorción percutánea de un fármaco. En este método no influyen modificaciones de la dosis, vehículo, tiempo de aplicación o zona de administración. También, ha resultado ser una técnica válida en animales y hombres.

Esta técnica es muy simple y se basa en los conocimientos de las propiedades de barrera del estrato córneo. El estrato córneo presenta un espesor de micrómetros o nanómetros y baja difusividad, por ello, los compuestos quedan retenidos durante un largo periodo de tiempo en los intersticios que lo constituyen. Tras la administración de un fármaco sobre la piel transcurre un periodo de tiempo durante el cual la fracción que particiona hacia el estrato córneo se retiene en su interior. La absorción total del fármaco se puede determinar si se elimina el estrato córneo antes de que se produzcan pérdidas significativas, por fenómenos de difusión a capas más profundas.

Para la utilización de este método se sigue un protocolo ya establecido. Este método consiste en aplicar una cinta adhesiva sobre la superficie de la piel, ejerciendo una presión firme y retirándola posteriormente. El material recuperado se cuantifica mediante procedimientos analíticos adecuados (Schaefer y cols., 1999). Este método presenta el inconveniente de no poder aportar datos relativos a la velocidad de absorción, como la cantidad máxima absorbida y el tiempo para alcanzar la concentración máxima.

Este método se emplea para predecir la absorción percutánea de fármacos que se administran durante un corto periodo de tiempo. Se ha utilizado para verificar la toxicidad de excipientes empleados en cosmética y para ensayar la bioequivalencia de formulaciones de corticoesteroides (Persing y cols., 1994). Es una técnica sencilla, exacta y rápida y permite utilizar procedimientos analíticos que no emplean radioisótopos. Otro factor a tener en cuenta es que es una técnica no invasiva en humanos.

2.8.- Métodos para la determinación de la absorción percutánea in vitro

Los ensayos de difusión in vitro, realizados en celdas de difusión en las que se emplean membranas biológicas (animales o humana) o artificiales, son los métodos más utilizados para la predicción de la absorción percutánea (Gasco y cols., 1988; Willmann y cols., 1992; Liu y cols., 1995; Santoyo y cols., 1996; Gao y Singh, 1998).

El empleo de membranas biológicas presenta una serie de ventajas en el desarrollo de ensayos in vitro, ya que las propiedades de barrera se mantienen intactas durante muchos días y la piel se puede almacenar por congelación durante largos periodos de tiempo, aportando gran flexibilidad a este método. Además, es un método simple, de bajo coste y está sometido a pocas normativas reguladoras en comparación con los ensayos in vivo. Los ensayos de cesión in vitro permiten predecir la máxima biodisponibilidad de nuevas formulaciones evitando la necesidad de utilizar voluntarios humanos.

2.8.1.- Piel humana

En los estudios de absorción percutánea lo ideal es utilizar piel humana si las investigaciones realizadas tienen como objetivo fundamental aplicaciones clínicas.

Aunque la mayoría de las veces es difícil obtener piel de forma regular, hoy en día, existe la posibilidad de conseguirla a través de proveedores comerciales de órganos, solucionándose, en cierta manera, este inconveniente. Los proveedores aportan toda la información requerida sobre la piel suministrada (edad, localización en el cuerpo, sexo, raza, causa de la muerte, condiciones de congelación y almacenamiento) para la posterior evaluación de los resultados obtenidos en los ensayos de absorción.

Uno de los inconvenientes es que la piel, obtenida a través de proveedores, es tratada con solventes y sometida a procesos de congelación criogénica. Estos

tratamientos dan lugar a la extracción de lípidos y materiales proteicos y alteran las estructuras que constituyen la piel. Otro factor a tener en cuenta, durante los ensayos in vitro con piel humana, es la variabilidad de su espesor según la región del cuerpo humano de la que proceda. La actividad metabólica de la piel descongelada se encuentra disminuida como consecuencia del proceso de congelación a la que se le ha sometido.

Entre los individuos se ha observado una gran variabilidad en la permeabilidad de la piel, observándose que dicha variabilidad es mucho menor in vivo que in vitro (Southwell y cols., 1984).

Para la mayoría de los compuestos, principalmente hidrófilos, el estrato córneo constituye la primera barrera en la difusión. También existen casos de fármacos lipófilos cuya partición desde el estrato córneo hacia tejidos viables da lugar a flujos transdérmicos bajos (Guy y Hadgraft, 1988). La mayoría de los fármacos pasan a circulación sistémica debido a los microvasos situados próximos al estrato córneo, a una profundidad de 150-250 μm de la superficie de la piel. La microcirculación se encuentra muy próxima a la unión existente entre la dermis y la epidermis (40 a 50 μm de espesor). En condiciones in vitro, esta microcirculación no existe, por lo tanto, un aspecto importante del diseño de los experimentos in vitro es la capacidad de imitar las condiciones que existen in vivo en la piel.

2.8.2.- Modelos de piel humana

- Piel de animal: los ensayos de cesión in vitro que se realizan en celdas de difusión, con el fin de predecir la absorción de los fármacos a través de la piel, emplean membranas biológicas procedentes de diferentes modelos animales (Ritschel y Birkhaus, 1988; Santoyo y cols., 1996; Tang-Liu y cols., 1988; Gao y Singh, 1998).

La mayoría de los estudios de cesión in vitro se realizan con el objetivo de predecir la absorción en humanos, siendo la piel humana la membrana más apropiada para estos estudios. La piel humana se caracteriza por presentar gran variabilidad inter e intraindividual (Southwell y cols., 1984) y diferente difusividad del fármaco a través de estrato córneo en función de la parte del cuerpo de la cual proceda (Bennett y Barry, 1987).

Los ensayos in vitro que se realizan con piel humana son menos frecuentes, debido a la dificultad que los investigadores encuentran para la obtención de la misma. Por lo tanto, durante los últimos treinta años se ha intentado identificar un modelo animal cuyas propiedades de barrera sean muy parecidas a las que existen en la piel humana. Finalmente, se ha llegado a la conclusión de que la piel humana es única, y no existe un modelo animal que se acepte universalmente en su sustitución. La FDA/AAPS Workshop sobre "*Principios y Prácticas de los Estudios in vitro de Absorción Percutánea*" recomienda utilizar la piel humana en los estudios de cesión in vitro pero, debido a su limitada disponibilidad, permite el empleo de piel procedente de animales para la predicción de la absorción percutánea de fármacos (Franz y Lehman, 1995).

La piel procedente de animales, presenta una serie de ventajas:

- Fácil de obtener.
- Control de determinados factores, como la edad y sexo de los animales.
- Obtención de un gran número de muestras.

Estudios recientes han sugerido que las propiedades que presenta la piel de cerdo son muy parecidas a las de la piel humana. Los resultados obtenidos en estos estudios fueron comparados con los datos publicados en humanos. En los estudios realizados se demostró una excelente correlación en los resultados obtenidos entre ambas especies (Bronaugh y cols., 1982; Franz y Lehman, 1995).

El estudio de otros modelos animales ha dado lugar a resultados desconcertantes. Para algunos fármacos existe una buena correlación entre el modelo animal empleado y la piel humana pero, para otros fármacos, este mismo modelo animal no sirve como sustituto de la piel humana ya que los datos obtenidos son totalmente diferentes. Los modelos animales presentan grandes limitaciones para predecir la absorción *in vitro* a través de la piel humana. Distintos estudios han demostrado que la piel de conejo y de roedores presenta propiedades muy diferentes a la piel humana. La piel de conejo, en particular, da resultados de absorción mucho mayores que los obtenidos con piel humana, mientras que la piel de ratón (sin pelo), muy utilizada en numerosos trabajos de investigación, no ha resultado ser un buen modelo (Rigg y Barry, 1990).

En otros trabajos se han empleado piel de rata y serpiente, pero estos modelos han presentado las mismas limitaciones que los anteriores (Okamoto y cols., 1987; Ogiso y Shintani, 1990). El principal inconveniente encontrado por algunos autores al utilizar piel de roedores, como modelo de la piel humana, es la excesiva estimación en la permeabilidad relativa con respecto a la piel humana (Bond y Barry, 1988; Catz y Friend, 1990). Este problema se debe principalmente a los efectos de hidratación que se producen en los ensayos *in vitro*, cuando existe una prolongada exposición de la piel con los fluidos que constituyen el medio donador y receptor. Además, se produce una disminución en las propiedades de defensa de la piel (Bond y Barry, 1988).

La principal diferencia entre la piel humana y la de roedores, es la composición lipídica y la organización estructural del estrato córneo. La piel de algunas especies de roedores es útil, en el estudio de absorción de fármacos, cuando el tiempo de exposición es igual o inferior a 12 horas (Hinz y cols., 1989). El empleo de piel de cobaya (sin pelo) ha dado resultados esperanzadores aunque los datos, obtenidos hasta la fecha, no son suficientes para obtener conclusiones.

- Cultivo de tejidos: en este campo se han conseguido avances significativos con el fin de obtener un modelo adecuado de piel humana. También, se han realizado estudios sobre la utilización de piel reconstituida, obtenida a partir de cultivos de equivalentes de piel, con el objetivo de obtener sistemas *in vitro* capaces de predecir la absorción percutánea y la toxicidad potencial de ciertos compuestos (Ponec y cols., 1990). En este tipo de cultivos, las queratinas y algunos enzimas responsables de la descamación se expresan correctamente en las capas estratificadas del epitelio.

Sin embargo, otra serie de componentes de la piel, como la involucrina y la transglutaminasa, se expresan en las capas inferiores del estrato espinoso. Este hecho indica que la diferenciación epidermal no refleja completamente la distribución in vivo del tejido. Existe poca similitud en la composición lipídica del estrato córneo procedente de estos cultivos y la existente in vivo (Ponec, 1991).

Por otro lado, en este tipo de cultivos se ha visto que el contenido total de ceramidas es similar al que existe en la piel. Sin embargo, se encuentran variaciones respecto a la cantidad de fracciones polares y apolares presentes en las ceramidas. La conclusión de estos resultados es una mayor investigación para la mejora de este tipo de cultivos.

Para evaluar la permeabilidad de nitroglicerina y sacarosa se ha empleado la epidermis humana reconstruida (Ponec y cols., 1990). El estrato córneo reconstituido se ha estudiado como modelo potencial para predecir la absorción de fármacos a través de la piel (Kock y cols., 1988). Actualmente, la piel humana obtenida de intervenciones plásticas, y cadáveres y la procedente de animales de laboratorio constituyen las principales opciones para evaluar la permeabilidad in vitro de la piel.

- *Membranas artificiales:* las membranas artificiales se emplean de forma frecuente en los estudios de preformulación. Sin embargo, para poder emplear este tipo de membranas, como modelos que permitan sustituir a la piel humana, deben imitar las propiedades de barrera que presenta el estrato córneo. El empleo de membranas artificiales impregnadas con miristato de isopropilo, un lípido que forma parte de los lípidos de la piel, se han utilizado como modelos para simular las propiedades de barrera de la epidermis (Hadgraft y Ridout, 1987).

También se han empleado membranas de tipo hidrofóbico con este fin: politetrafluoroetileno (PTFE), propileno (PP), difluoruro de polivinilideno (PVDF), silicona y polidimetilsiloxano (Lalor y cols., 1994; Lin y cols., 1996; Santoyo y cols., 1996). Otros autores emplean una doble membrana hidrófila / lipófila (membrana de diálisis de celulosa / membrana de nitrato de celulosa) impregnada con dodecanol (Ktistis y Niopas, 1998; Gasco y cols., 1988). Mediante el empleo de estos alcoholes las membranas hidrófilas se convierten en lipófilas.

2.8.3.- Preparación de la piel

Las secciones de piel empleadas en investigaciones in vitro, se pueden preparar con distintos espesores:

- Espesor completo (epidermis y dermis), 1-4 mm de espesor para la piel humana.
- Espesor reducido, en la que una parte de la dermis es eliminada (0,25-0,50 mm).
- Epidermis aislada (~0,10 mm).
- Estrato córneo aislado (~0,02 mm).

Desde el punto de vista teórico, lo ideal es emplear secciones de piel de espesor reducido o de epidermis aislada, ya que la distancia entre la superficie de la piel y el medio receptor es la que más se aproxima a la que existe in vivo entre la superficie de la piel y el torrente circulatorio. Desde el punto de vista práctico, esta cuestión es únicamente importante cuando se emplean fármacos liposolubles. Debido a que la dermis ofrece poca resistencia al paso de fármacos solubles en agua, su presencia o ausencia tiene solo un pequeño efecto sobre la velocidad de absorción de estos fármacos. Para demostrar este hecho se han realizado estudios en los que se emplean secciones de piel con todo su espesor y se administran fármacos hidrosolubles. En estos estudios se ha encontrado una buena correlación entre los resultados in vivo e in vitro.

Por el contrario, la dermis influye en la velocidad de absorción de fármacos liposolubles, ya que ésta presenta un 70% de agua en su composición, y por lo tanto constituye el paso limitante en la absorción de este tipo de fármacos. Así, la inclusión de dermis (1-2 mm) durante los ensayos in vitro puede llevar a un error significativo en los datos obtenidos, ya que en condiciones in vivo el fármaco no la atraviesa.

En relación a lo comentado anteriormente, la FDA/AAPS Workshop sobre *"Principios y Prácticas de los Estudios in vitro de Absorción Percutánea"* recomienda la utilización en estudios in vitro de preparaciones de epidermis dermatomizadas de muy poco espesor (< 0,5 mm) o epidermis aislada (Franz y Lehman, 1995). En los ensayos de absorción in vitro con fármacos hidrosolubles conviene utilizar piel con todo su espesor.

Los estudios de absorción en los que se utiliza estrato córneo aislado son poco frecuentes y únicamente se emplean para identificar la contribución de cada una de las capas que constituyen la piel en el proceso difusional del fármaco, o para determinar la contribución de cada una de estas capas en el metabolismo del fármaco. Las muestras de piel con todo su espesor (dermis y epidermis) son fáciles de preparar ya que sólo se necesita eliminar la grasa subcutánea adherida, generalmente ausente en la piel de los animales. En piel humana el espesor de esta capa de grasa puede ser similar a la de la piel y se deben tomar precauciones para que no contamine la superficie de la misma. La superficie de la piel nunca se debe lavar con agua y jabón ya que los tensioactivos pueden alterar sus propiedades de barrera.

La reducción del espesor de las secciones de piel mediante la eliminación de una parte de la dermis se realiza con un dermatomo. En esta técnica se puede emplear piel con pelo o sin pelo. La piel se debe estirar para evitar la formación de arrugas que dificulte este proceso. Se recomienda que el espesor de la sección dermatomizada, empleada en estudios in vitro, sea menor de 0,5 mm.

Las muestras de epidermis aislada se obtienen por separación mediante calor (Franz y Lehman, 1995). La piel constituida por la dermis y epidermis se introduce en agua a 60°C y se mantiene durante 1-2 minutos entre bloques de aluminio calentados a la misma temperatura. La piel, con la epidermis hacia arriba, se sitúa sobre un bloque donde se estira y se elimina la dermis mediante fórceps. Cuanto más tiempo se mantenga la piel a 60°C con mayor facilidad se eliminará la dermis. Las muestras intactas de epidermis no se pueden preparar a partir de piel de animal con pelo debido a

que los folículos pilosos están introducidos profundamente en la dermis, originándose orificios en la epidermis. Además, este procedimiento no es útil para estudios metabólicos ya que la viabilidad de la piel se puede ver afectada.

También, se puede preparar epidermis aislada mediante un proceso que consta de dos etapas. Primero se separa mediante calor, como se indicó anteriormente, y después se trata con enzimas proteolíticas (tripsina) para desorganizar la integridad de las células vivas y facilitar su eliminación desde la parte inferior del estrato córneo.

Por otro lado, el estrato córneo se puede obtener directamente a partir de piel humana, mediante el empleo de agentes capaces de producir ampollas en la piel.

2.8.4- Conservación de la piel y validación

Las muestras de piel humana que se obtienen en autopsias o en procedimientos quirúrgicos no se puede utilizar directamente. El almacenamiento de estas muestras en recipientes de material plástico impermeable a -20°C o temperaturas inferiores mantiene la función de barrera de la piel durante muchos meses. La conservación de la piel en frigorífico durante 48 horas no produce alteración en la integridad de sus propiedades de barrera. Este mismo efecto se ha observado cuando se almacena mediante congelación (Franz, 1975). Sin embargo, otros autores opinan todo lo contrario, por lo que la validación de la integridad de las propiedades de barrera debe ser siempre realizada sin importar el método o la duración del proceso de conservación.

Hay una variedad de factores fisiológicos que se deben tener en cuenta cuando se evalúa la permeabilidad de la piel humana en condiciones *in vitro*. Siddiqui (1989) ha revisado recientemente estos factores. El modo de conservación de la piel es un factor a tener en cuenta antes de emplearla en los ensayos de absorción *in vitro*. Normalmente, se congela la piel para almacenarla hasta que se utilice en los ensayos correspondientes.

Existen opiniones contradictorias respecto a la posible alteración de las propiedades de defensa de la piel durante el proceso de congelación de la piel. Franz (1975) comprobó que la congelación de la piel durante un periodo de tres meses no producía alteración en dichas propiedades. Sin embargo, Swarbrick y cols. (1982) observaron un aumento de la permeabilidad cuando la piel era descongelada, en comparación con la permeabilidad que presentaba esta misma piel antes de su congelación. Se recomienda la utilización de glicerol durante el almacenamiento de la piel mediante congelación, ya que inhibe la formación de cristales de hielo que pueden producir daño tisular.

Para comprobar la integridad y la funcionalidad de cualquier preparación de piel se recomienda el empleo de agua tritiada ($^3\text{H}_2\text{O}$). La variabilidad inherente que surge en los estudios de absorción se reduce significativamente cuando la piel se trata inicialmente con $^3\text{H}_2\text{O}$ (Franz y Lehman, 1995). Esto permite descartar aquellas preparaciones que aparentemente parecen estar en buen estado pero que microscópicamente presentan imperfecciones. De esta forma se delimita las condiciones aceptables para cada situación experimental, y permite que los datos obtenidos puedan

ser comparados. No se puede mantener la viabilidad de la piel durante su conservación mediante congelación, ya que el proceso de congelación y descongelación de las muestras da lugar a una destrucción de la actividad metabólica de las células en la piel. Por lo tanto, este tipo de preparaciones no se deben emplear en estudios metabólicos. La piel de animales es mucho más susceptible al daño originado por el proceso de congelación, y además se ha observado una reducción en las propiedades de barrera (Franz y Lehman, 1995).

2.8.5.- Celdas de difusión utilizadas en los estudios de absorción in vitro

Durante los últimos 30 años se han diseñado y empleado un gran número de celdas de difusión en los estudios de absorción in vitro. Sin embargo, la mayoría de los diseños se encuentran dentro de dos categorías: 1) celdas de difusión "side by side" o celdas horizontales y 2) celdas de difusión verticales que permiten imitar las condiciones in vivo.

En función de las necesidades del estudio de absorción in vitro que se pretenda realizar se encuentran disponibles diferentes tipos de celdas. Se pueden distinguir cuatro tipos de celdas de difusión in vitro:

- 1)- Celdas horizontales de dos compartimentos o "side by side".
- 2)- Celdas verticales de un solo compartimento.
- 3)- Celdas de flujo continuo.
- 4)- Celdas de difusión empleadas en estudios de iontoforesis y sonoforesis.

1)- Celdas horizontales o "side by side": se emplean, normalmente, para realizar los clásicos experimentos con dosis infinitas en los que se alcanza el estado estacionario durante el ensayo de cesión. Hoy en día, estas celdas se utilizan para estudiar los mecanismos de absorción y la cesión transdérmica de fármacos. Este tipo de celdas está constituida por dos cámaras, una de las cuales contiene el componente que se va a absorber y la otra el medio receptor.

Estas dos cámaras se encuentran separadas por una membrana (piel en los experimentos de absorción percutánea). El contenido de una o de ambas cámaras se encuentra sometido a agitación para asegurar la adecuada dispersión de las moléculas del fármaco y minimizar la difusión estática de las capas limitantes.

Existen dos tipos de configuraciones de celdas de difusión "side by side":

- En forma de T (Washitake y cols., 1980).
- En forma de L (Tojo y cols., 1985).

La mayoría de las celdas están fabricadas con cristal, como es el caso del diseño del matraz cónico modificado de Wuster y cols. (Washitake y cols., 1980) (Figura 10). Estas celdas presentan varios inconvenientes, siendo el más importante la imposibilidad de agitar las soluciones desde el interior. Para solucionar este problema los autores proponen la agitación de todo el sistema en el plano de la membrana. El control de la

temperatura se efectúa introduciendo todo el montaje en un baño de agua termostatzado. Se ha demostrado que este diseño es válido para aquellos compuestos que difunden rápidamente, sin embargo, no es de gran utilidad en los ensayos de cesión in vitro.

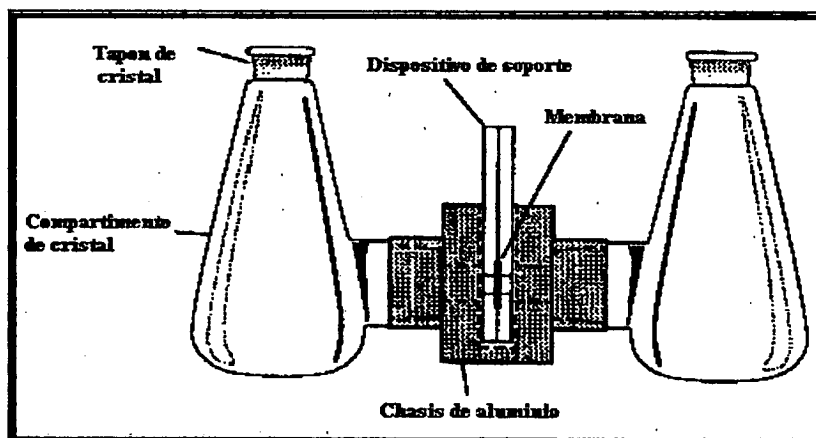


Figura 10. Celda de difusión horizontal diseñada por Wuster y cols. (1980)

En la figura 11 se observa un diseño más complejo ideado por Flynn y Smith (1971).

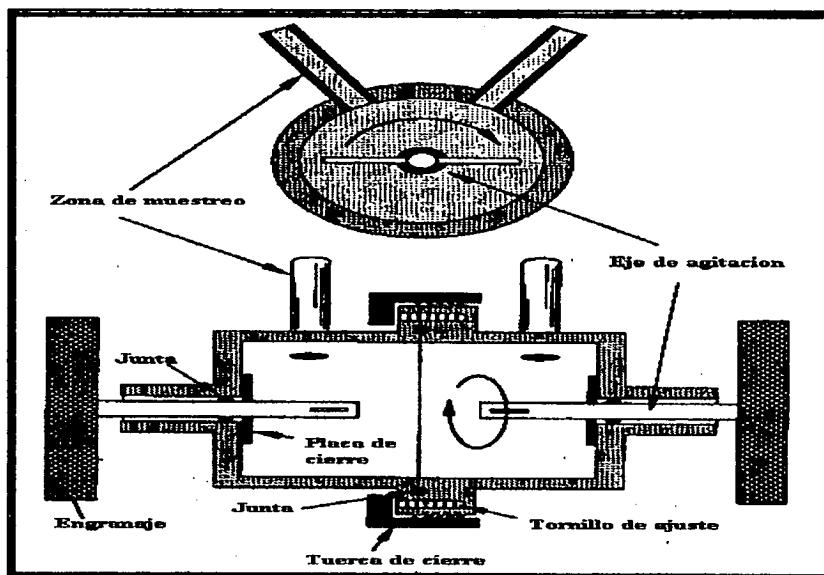


Figura 11. Celda de difusión horizontal diseñada por Flynn y Smith (1971).

En esta celda los compartimentos están fabricados de latón. Estos compartimentos se encuentran unidos entre sí con un montaje de tuerca y tornillo. La membrana se sujeta entre anillos en forma de O, situados alrededor del borde de la membrana. Los agitadores de teflon de gran tamaño están montados en posición vertical respecto a la membrana. Estos agitadores están asociados a engranajes que a su vez se unen a un motor sincronizado. La sustitución del fluido del compartimento se lleva a cabo por un sistema de muestreo localizado en ambos compartimentos. Todo el sistema se encuentra sumergido en un baño termostatzado para controlar la temperatura. En este diseño se emplean grandes secciones de membrana, lo que limita su utilidad. Las características de esta celda son adecuadas para el estudio de absorción in vitro de

fármacos. Sin embargo, la complejidad de su mecanismo limita la utilización de estos sistemas, a pesar de sus ventajas sobre otras celdas de difusión in vitro.

Otro diseño de celda de difusión "side by side" se observa en la figura 12 (Southwell y Barry, 1983). Esta celda presenta dos compartimentos de cristal, con un pequeño área difusional, termostatizados por su inmersión en un baño de agua. En ambos compartimentos, la agitación se realiza mediante barras magnéticas de teflon. Un agitador magnético se sitúa debajo de todo el sistema para producir una agitación sincronizada de las barras magnéticas en ambos compartimentos. La membrana se sujeta por una malla de acero inoxidable. El muestreo desde el compartimento donador y receptor se realiza a través de un dispositivo en forma de tubo que se localiza en la parte superior de cada compartimento. Estos dispositivos están sellados con parafilm. Dependiendo de la altura que alcance el medio receptor o donador en los dispositivos de muestreo, la agitación del medio puede resultar inadecuada si una parte substancial de la solución receptora o donadora se encuentra dentro del dispositivo de muestreo.

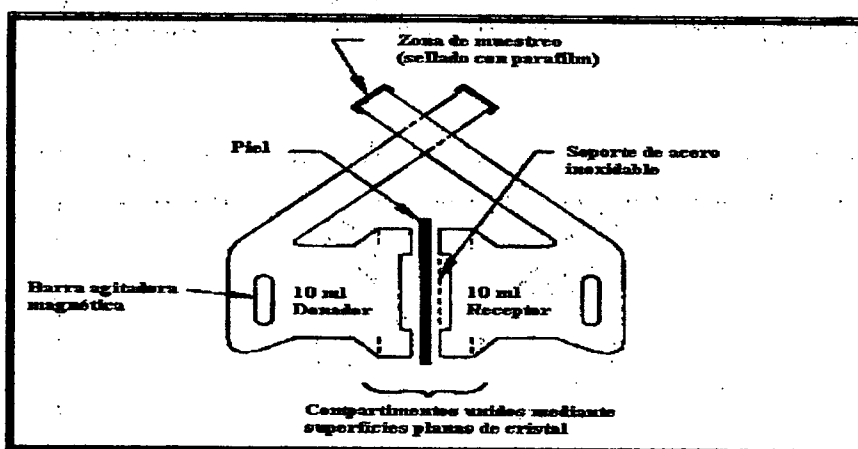


Figura 12. Celda de difusión horizontal diseñada por Southwell y Barry (1983).

Chien y cols. (1984) han estudiado detalladamente una celda de difusión "side by side" denominada celda *Valia-Chien* (Figura 13).

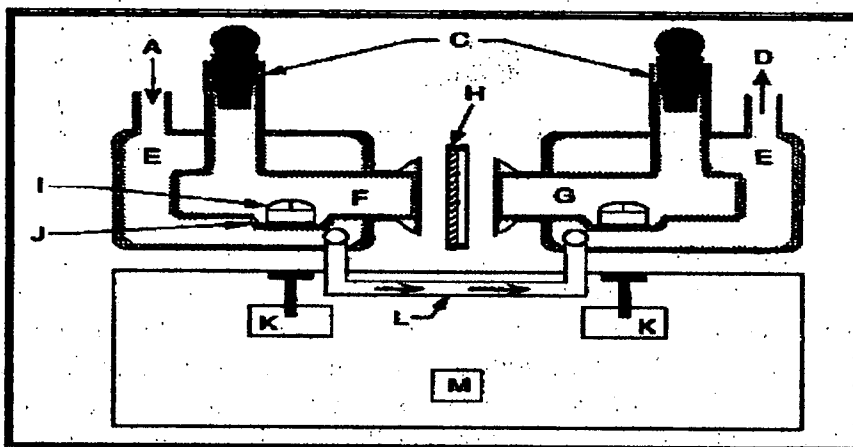


Figura 13. Celda de difusión Valia-Chien. A. Entrada de admisión de agua a 37°C; B. Tapón de cristal; C. Entrada para la toma de muestra; D. Salida de agua; E. Camisa de agua; F. Compartimento donador (4 ml); G. Compartimento receptor (4ml); H. Piel (0,64 cm²); I. Barra magnética; J. Plataforma de agitación; K. Motor; L. Tubo de conexión; M. Botón de encendido y apagado.

Existe un diseño de celda de difusión horizontal en la que se combina un compartimento donador con agitación magnética y un compartimento receptor a través del cual pasa un flujo a una velocidad determinada (Astley y Levine, 1976). La entrada del medio receptor está localizado en la parte central de la membrana. La salida del fluido receptor se recoge desde el exterior. Esta celda de difusión evita que el fármaco se acumule en la interfaz de la membrana y el fluido del compartimento receptor, por lo que se mantienen las máximas condiciones sink.

Los resultados aportados por las celdas horizontales o "side by side" son muy diferentes a los obtenidos en los ensayos de absorción in vivo. Sin embargo, en los estudios realizados con este tipo de celdas se han obtenido una gran cantidad de datos relevantes. En las celdas horizontales, la membrana biológica (piel) está expuesta al fluido que constituye ambos compartimentos pudiendo dar lugar a potenciales efectos de solvatación. Los resultados que se obtienen mediante este tipo de celdas, únicamente, son válidos si se conocen las limitaciones de dicho diseño. Por estos motivos, la predicción de la cantidad de fármaco que se puede absorber en condiciones in vivo requiere del diseño de celdas distintas a las mencionadas anteriormente.

2)- Celdas verticales: las celdas de difusión empleadas para simular las condiciones encontradas en estudios in vivo son normalmente verticales, donde el compartimento inferior contiene el medio de difusión. Como ocurre in vivo, la superficie externa de la piel se expone a las condiciones ambientales.

Como se ha comentado anteriormente, el objetivo principal de este tipo de celdas es imitar las condiciones físicas que aparecen in vivo y mantener, de esta forma, los dos factores físicos más importantes que controlan la absorción bajo condiciones fisiológicas. Con este diseño se mantienen los gradientes de temperatura y humedad relativa, que normalmente existen a través de la piel.

El medio que constituye el compartimento receptor se agita o recicla con el objetivo de mantener "condiciones sink" durante todo el experimento. Una ventaja de este tipo de celdas es la posibilidad de variar la naturaleza del vehículo donador. Así, se pueden estudiar películas de material aplicadas por evaporación del solvente, membranas sintéticas situadas en serie con la piel, pomadas, pastas y sistemas de administración transdérmica. En este tipo de celdas se pueden controlar las condiciones ambientales. Además, se pueden utilizar para evaluar el efecto de exaltadores de la permeabilidad de la membrana. También, pueden llevarse a cabo experimentos con dosis finitas e infinitas. El diseño experimental varía dependiendo del tipo de formulación sometida a estudio.

Durante los últimos 30 años se han estudiado y diseñado un gran número de celdas. Una de las primeras celdas verticales empleadas es la diseñada por Coldman y cols. (Coldman y cols., 1969) (Figura 14). Esta celda está fabricada de cristal y consta de un brazo lateral para la toma de muestra. Una barra agitadora unida a un aspa de polietileno permite la agitación del medio receptor. La piel se sostiene por un disco de teflón sobre una superficie lisa de cristal en la parte superior del compartimento receptor. En esta celda, el área de superficie expuesta es de $0,30 \text{ cm}^2$ y el volumen del compartimento receptor de 10 ml, encontrándose una porción del mismo localizado en

el brazo lateral empleado para el muestreo, y donde la agitación del medio no se realiza de forma adecuada. En este tipo de celdas no se ha estudiado exhaustivamente las características de agitación del medio y la difusión del fármaco.

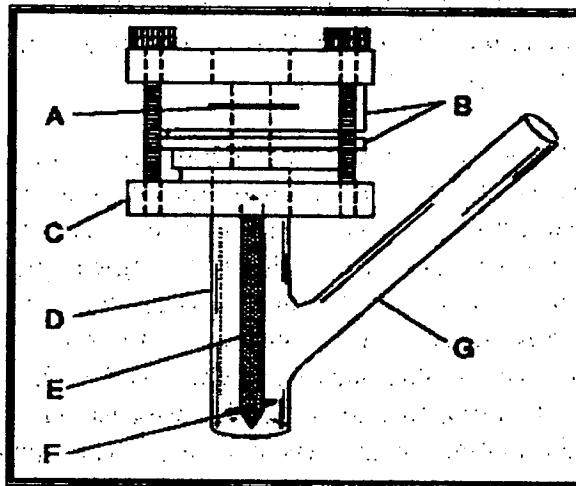


Figura 14. Celda vertical diseñada por Coldman y cols. A: Piel; B. Soporte de teflon para sujetar la piel; C. Abrazadera; D. Cámara receptora; E. Aspa de polietileno; F. Barra magnética de teflon.

Barry y colaboradores (Whitton y Everall, 1973) estudiaron un tipo de celda vertical (Figura 15), constituida por una de las mitades procedente de una celda de difusión horizontal (Figura 10) situada verticalmente con un compartimento donador localizado en la parte superior. Los componentes que constituyen esta celda son los mismos que presenta la celda de difusión horizontal diseñada por Wuster y cols. En este tipo de celda, parte del medio receptor se localiza en el brazo lateral del compartimento receptor.

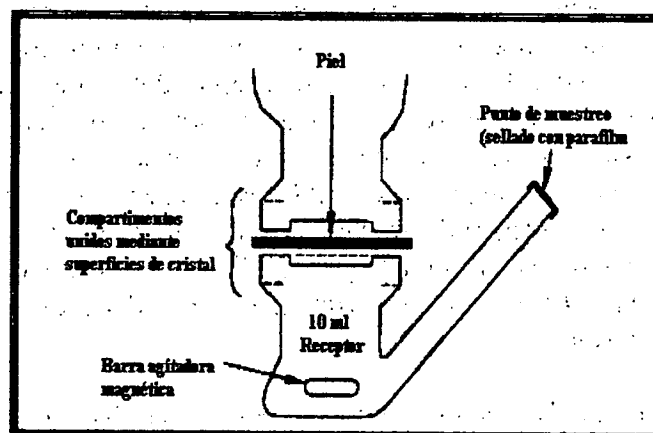


Figura 15. Celda de difusión vertical utilizada para estudios de absorción en el estado estacionario.

La celda de difusión de Franz es una de las más utilizadas para los estudios de absorción in vitro. La primera celda de Franz se diseñó en 1978 (Franz, 1978) y se comercializó posteriormente. Esta celda presenta un pequeño compartimento donador y un compartimento receptor en forma de pesa (Figura 16). La parte inferior del compartimento receptor se comunica con un tubo cilíndrico más estrecho, que se

ensancha en la parte superior del compartimento, próximo al área de contacto con la membrana. En el diseño original, la celda era estática y presentaba un único lugar para la toma de muestra, que no estaba cubierto. La parte central del compartimento receptor se encuentra rodeado por una camisa de agua que permite el control de la temperatura. Algunas partes del compartimento receptor y todo el compartimento donador están en contacto con el medio externo. Como en la mayoría de las celdas verticales, el medio receptor se encuentra en continua agitación mediante una barra magnética.

En el diseño original de la celda de Franz se ha introducido un gran número de modificaciones. Así, se introdujeron rebordes en forma de anillo y un segundo brazo lateral para permitir el flujo a través del sistema. Además, el compartimento donador se puede sellar y fabricar con distintos diámetros de área de exposición. Este tipo de celdas es muy utilizada, pero presenta una serie de inconvenientes, principalmente, debidos a la pobre agitación hidrodinámica. Esta pobre agitación puede deberse a que la agitación en la parte inferior del compartimento se debe transmitir a través del estrecho brazo lateral por donde se realiza el muestreo. Existe una resistencia considerable al flujo del fluido en la porción mas estrecha del compartimento receptor, que da lugar a una capa limitante estática en la interfaz entre la membrana y la solución receptora.

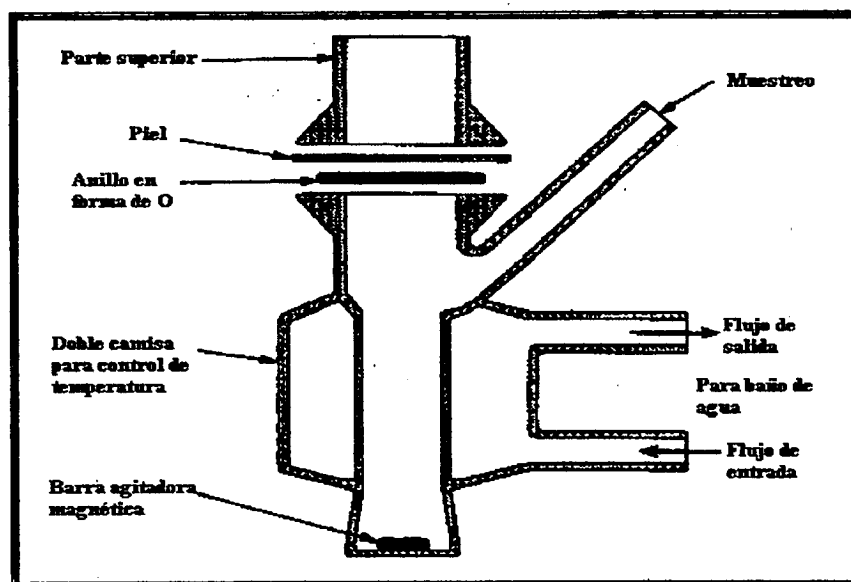


Figura 16. Celda de difusión de Franz.

3)- Celdas de flujo continuo: a partir de los inconvenientes observados en la celda de Franz se diseñaron dos celdas de flujo continuo (Gummer, 1987). Estas celdas se emplean en los estudios de absorción in vitro con el fin de solventar dichos inconvenientes, entre los que se incluye la insuficiente agitación. Ambos tipos de celdas presentan distinta área en la superficie de exposición. La parte más importante de este diseño es el compartimento receptor. Su diámetro es superior al de la celda de Franz, lo que permite alcanzar una rápida y uniforme agitación. Como se puede ver en la figura 17, en estas celdas existe un flujo constante a través del compartimento receptor donde las condiciones sink se mantienen fácilmente. Los anillos en forma de O están ausentes y la piel se sujeta entre dos superficies de cristal. En el diseño de ambos tipos de celdas,

el tiempo necesario para alcanzar una dispersión homogénea de un colorante incorporado en el compartimento receptor fue inferior a 30 segundos (Friend, 1992).

Las celdas de flujo continuo ofrecen una alternativa a las celdas que presentan un brazo lateral por donde se realiza el muestreo, ya que el compartimento receptor se sustituye por una base continua (no existe brazo lateral). Como resultado, el diseño de celdas de flujo continuo asociado a una cámara vertical permite obtener unas condiciones lo más similares posibles a las encontradas in vivo.

Una de las primeras celdas de difusión de flujo continuo se diseñó por Marzulli (Marzulli, 1962). Este tipo de celdas presenta numerosos inconvenientes, tales como: condiciones inadecuadas debido a su diseño cilíndrico, la entrada al medio receptor no está próxima a la membrana, el fármaco o formulación sometida al estudio de difusión no se elimina completamente, existe mayor probabilidad de que aparezcan capas de difusión estáticas cuando se evalúan compuestos lipófilos durante los ensayos de cesión. Una mejora en este diseño es la inclusión de un agitador.

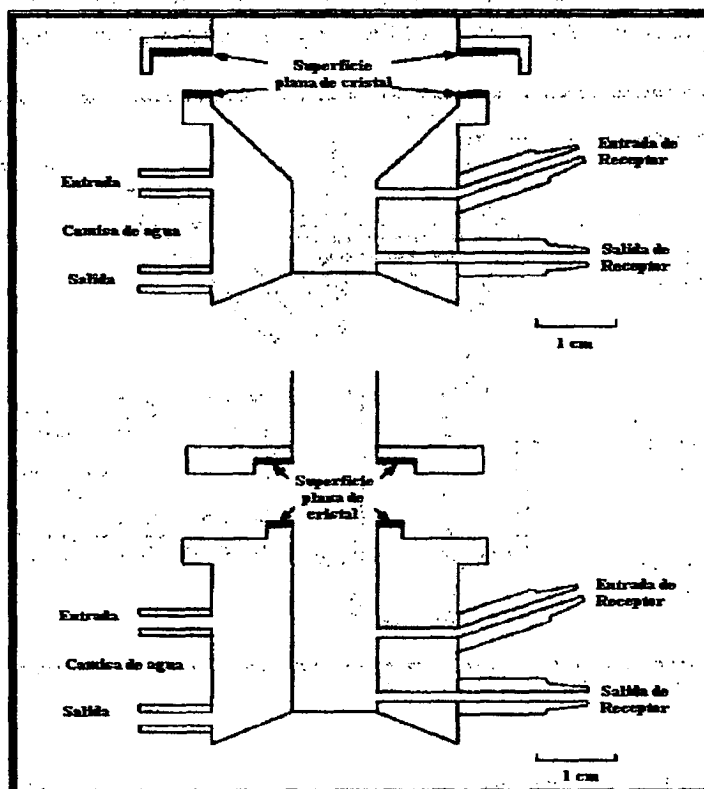


Figura 17. Celdas de difusión de flujo continuo. El compartimento superior tiene una capacidad de 5,3 ml, el compartimento inferior de 3,0 ml.

Para el estudio de fenómenos de evaporación-absorción se diseñaron otros sistemas más novedosos y complicados. Así, se emplearon celdas de flujo continuo con agitación mediante barra magnética (Hawkins y Reifenrath, 1986). El compartimento receptor se encuentra termostatzado mediante una camisa de agua. El compartimento donador se diseñó para controlar la evaporación de la superficie de la piel mediante una ventilación forzada de aire templado (Figura 18).

Uno de los problemas encontrados, en las celdas de difusión de flujo continuo, es la localización de burbujas de aire debajo de la superficie de la piel. Estas burbujas reducen sustancialmente el área de difusión y, por lo tanto, éstas se deben eliminar mediante desgasificación de solventes. Otro inconveniente es la posibilidad de aparición de fenómenos de absorción, en particular con fármacos de carácter lipófilo, en los tubos de muestreo del fluido del compartimento receptor. Además las barras magnéticas de teflon empleadas en la agitación también pueden absorber solutos lipófilos.

Las membranas biológicas empleadas en los estudios de absorción *in vitro* son frágiles y difíciles de manejar. En particular, los estudios de absorción en los que se emplean láminas de estrato córneo presentan bastantes inconvenientes. Así, en este tipo de ensayos es difícil mantener el contenido en agua del estrato córneo. Para solucionar estos inconvenientes se emplean estructuras de apoyo para mantener la integridad del estrato córneo, y se ha desarrollado una nueva técnica para controlar el contenido en humedad de las membranas biológicas (Friend, 1992). Por tanto, el estrato córneo localizado, en esta celda, entre las membranas de silicona presenta un contenido en agua en equilibrio termodinámico con la solución salina situada al otro lado de la membrana. Un inconveniente de este sistema es la necesidad de determinar la permeabilidad del estrato córneo y de las membranas de silicona.

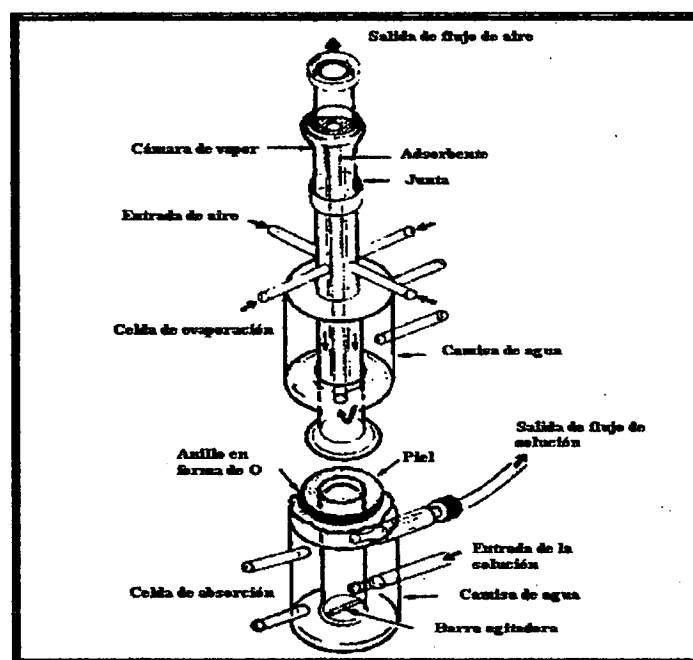


Figura 18. Celda de absorción-evaporación para la realización de ensayos *in vitro*.

Una variante muy útil del diseño de celdas con un solo compartimento, es la celda de flujo continuo diseñada por Bronaugh y Stewart (1984) donde la toma de muestra es automática. En este diseño, el fluido receptor es continuamente bombeado desde un reservorio hacia el compartimento receptor. El volumen del compartimento receptor suele ser bastante pequeño para permitir una reposición adecuada. Debido a que el fluido receptor se repone continuamente, las cinéticas obtenidas serán diferentes a las obtenidas en aquellos ensayos sin reposición, y dependientes de la velocidad de

bombeo del medio receptor. El ajuste matemático de los datos obtenidos en este tipo de celda nos permite calcular la velocidad de absorción real.

4)- Celdas de difusión empleadas en estudios de iontoforesis y sonoforesis: las celdas de difusión descritas en las secciones anteriores se diseñaron para el estudio de la difusión pasiva de fármacos. La iontoforesis y fonoforesis son técnicas empleadas para incrementar el flujo del fármaco a través de la piel.

Las celdas de difusión empleadas en la iontoforesis son similares a las utilizadas en los ensayos de difusión pasiva, a excepción de dos electrodos incorporados en el compartimento donador y receptor, respectivamente (Clemessey y cols., 1991). Aunque este tipo de celdas funciona bien experimentalmente, en condiciones in vivo presenta el inconveniente de que los electrodos no se pueden situar en zonas opuestas de la piel como ocurre in vitro. Glikfeld y cols.(1988) diseñaron una celda de iontoforesis para estudios in vitro considerando las condiciones in vivo. En este diseño, ambos electrodos se localizan en el mismo lado de la membrana (piel), consiguiéndose, de esta manera, una mayor similitud a las condiciones existentes in vivo.

La fonoforesis es una técnica que se estudia muy poco en condiciones in vitro. La mayoría de los experimentos requieren el empleo de equipos de ultrasonidos. Estos sistemas son demasiado grandes para su utilización en condiciones in vitro, particularmente cuando se emplea piel humana. El diseño de una celda de difusión capaz de variar los parámetros experimentales más importantes en la liberación fonoforética del fármaco, probablemente ayudaría a acelerar la investigación en éste área.

2.8.6.- Correlación in vitro-in vivo

El objetivo fundamental de los estudios de absorción percutánea es el ensayo en humanos, sin embargo no siempre es posible o deseable. En numerosos casos, la experimentación humana es muy costosa, lleva mucho tiempo y no siempre se puede realizar por consideraciones de tipo ético. Además, muchos compuestos resultan muy tóxicos para su administración en humanos. Por estas razones y por la simplicidad se prefieren los ensayos in vitro. Sin embargo, se duda si los resultados obtenidos en estudios in vitro reflejan el verdadero papel de la piel en el organismo.

A pesar de que los estudios comparativos de absorción in vitro e in vivo a través de piel humana son muy limitados, los datos existentes sostienen firmemente la relevancia de los estudios in vitro. Se ha encontrado una buena correlación in vivo e in vitro respecto a la absorción total entre 12 compuestos orgánicos vehiculizados en acetona (Franz y Lehman, 1995). Esta correlación ha sido muy buena para aquellos fármacos que se excretan rápidamente desde el organismo, como es el caso del ácido benzoico y el ácido hipúrico.

En un estudio similar se investigó la absorción de cafeína y testosterona desde diferentes vehículos, se obtuvo una buena correlación in vitro e in vivo (Bronaugh y Franz, 1986).

En los estudios mencionados anteriormente se intentó que las condiciones experimentales fueran lo más idénticas posibles. Los parámetros que se controlaron principalmente fueron: temperatura, humedad relativa, lugar de aplicación, tiempo de aplicación, dosis de la formulación y concentración de fármaco.

Por otro lado, los estudios de cesión in vitro con piel de animales son mucho más numerosos que los anteriores y tienden a mostrar una buena correlación in vitro e in vivo (Franz y Lehman, 1995).

CAPÍTULO III. SISTEMAS DISPERSOS

III.-SISTEMAS DISPERSOS

3.1.-Introducción

Una definición general del término sistema disperso, incluye a todos aquellos sistemas en los que una o más sustancias (fase(s) interna(s), fase(s) dispersa(s), o fase(s) discontinua(s)), se encuentran distribuidas o dispersadas dentro de otra fase, generalmente continua (la fase externa o medio dispersante).

Esta amplia definición de sistemas dispersos, podría incluir a la mayoría de las formas farmacéuticas; desde las dispersiones moleculares, también llamadas soluciones si la sustancia dispersa presenta bajo peso molecular, hasta las mezclas groseras de una sustancia pulverulenta distribuida en otra de la misma naturaleza. Un significado más conciso del término sistema disperso, hace referencia a varios tipos de sistemas coloidales en los cuales, la fase dispersa es de dimensiones coloidales y el sistema tiene una apariencia homogénea a simple vista.

En farmacia, el término incluye, generalmente, no sólo a coloides, sino también a dispersiones groseras, emulsiones y suspensiones en las que el tamaño de partícula de la fase interna es relativamente grande, y también a soluciones poliméricas y dispersiones sólidas.

3.2.-Clasificación de los sistemas dispersos

Desde el punto de vista farmacéutico, los sistemas dispersos se pueden clasificar de múltiples maneras. Existen dos tipos de clasificaciones según se tomen como criterios el estado físico de las distintas fases constituyentes del sistema o el tamaño de partícula de la fase dispersa:

Fase Dispersa	Medio de Dispersión		
	Sólido	Líquido	Gas
Sólida	Sólida en bases oleosas Sólidas en películas poliméricas	Suspensiones	Aerosoles sólidos
Líquida	Líquidos en bases oleosas	Emulsiones	Aerosoles líquidos
Gas	Aire en sólidos	Espumas	Ninguno

Tabla V.- Clasificación de los sistemas dispersos según el estado físico del medio de dispersión y de la fase dispersa^a.

^a Clasificación adaptada de Gennaro, A.R. y cols. y Dittert, L.W. (Nairn, 1991).

Categoría	Intervalo de Tamaños de Partícula	Características	Ejemplos
Soluciones moleculares	Menores de 1nm	Difunden rápidamente; atraviesan todos los filtros y la mayoría de las membranas semi-permeables.	Soluciones acuosas de cloruro potásico o de azúcares.
Dispersiones	Entre 1 nm y 1 μ m	Visibles por microscopía electrónica; difunden despacio; presentan movimiento Browniano; no atraviesan membranas semipermeables.	Micelas de moléculas anfipáticas; Microemulsiones.
Dispersiones groseras	Mayores de 1 μ m	Visibles por microscopía óptica; no difunden; carecen de movimiento Browniano; sedimentan o hacen creaming.	Casi todas las suspensiones y emulsiones farmacéuticas.

Tabla VI.-Clasificación de los sistemas dispersos según el intervalo de tamaños de partículas de la fase dispersa^a.

^a Clasificación adaptada por Dittert, L.W. y Martín, A., Swarbrick, J., y Cammarta, A. (Nairn, 1991).

Existe una tercera clasificación de sistemas dispersos, generalmente restringida a medios líquidos, basada en la interacción existente entre la fase dispersa y el medio de dispersión. Los sistemas liofílicos, son aquellos en los que existe una finalidad considerable de la fase dispersa por el medio de dispersión; si el medio líquido es agua, se puede utilizar el término hidrófilo, que es mucho mas restrictivo.

Los sistemas liofóbicos, son aquellos que presentan una pequeña o nula atracción entre las dos fases. Si el medio líquido es agua se puede utilizar el término hidrófobo.

El tercer grupo dentro de estas clasificaciones, incluye a moléculas denominadas anfifílicas, que poseen tantos grupos lipófilos como hidrófilos, y que forman, en el medio de dispersión, agregados de dimensiones coloidales llamados micelas.

3.3.-Utilización de sistemas dispersos en farmacia

Existen numerosas razones que explican el porqué de la preparación de sistemas dispersos dentro del campo farmacéutico. Probablemente, una de las más importante es la de presentar el fármaco en una concentración apropiada para su utilización, ya que los principios activos puros son muy pocas veces adecuados para la administración directa. Ciertos tipos de sistemas dispersos, en particular aquellos en estado líquido tales como suspensiones y emulsiones, permiten ajustar la dosis con facilidad; este aspecto es de

gran utilidad especialmente en niños o pacientes que requieren un ajuste de la dosis o que son incapaces de deglutir sólidos, como son los comprimidos.

Así mismo, como el tamaño de partícula del fármaco se encuentra reducido dentro del sistema disperso, el aumento de su superficie específica promueve un aumento en su grado de disolución, lo cual es de gran importancia cuando se trata de principios activos de baja solubilidad.

La utilización de sistemas dispersos ofrece la oportunidad de formular fármacos en una forma alternativa a las formas de dosificación convencionales. Así por ejemplo, las formas de administración orales podrían formularse como comprimidos, granulados o líquidos; pero podríamos llegar aún más lejos creando nuevas rutas de administración para los principios activos, que mejoren a las ya existentes.

Otro aspecto, fundamental y de gran actualidad, asociado a este tipo de sistemas es el relativo al control de la liberación de fármacos desde la forma farmacéutica. Se pueden conseguir liberaciones prolongadas y retardadas de principios activos bien utilizando formulaciones apropiadas en sistemas matriciales o mediante el uso de recubrimientos para las mezclas fármaco-excipientes.

Los sistemas dispersos tales como las soluciones poliméricas, se pueden emplear como recubrimientos para comprimidos con el objeto de aumentar la estabilidad química, mejorar sus características organolépticas e incluso identificar el producto. Así mismo, las preparaciones poliméricas líquidas nos permitirán un aumento en la estabilidad física de emulsiones y suspensiones, también sistemas dispersos.

Finalmente, estos sistemas mejoran el grado de cumplimiento de la pauta posológica por parte del paciente ya que permiten al fabricante la creación de productos farmacéuticos más agradables al gusto y más cómodos para su utilización.

3.4.-Microemulsiones

3.4.1.-Definición

Las microemulsiones son sistemas dispersos coloidales óleo-acuosos fluidos, termodinámicamente estables, homogéneos e isotrópicos, estabilizados por un tensioactivo en unión, en la mayoría de los casos, a un co-tensioactivo de naturaleza muy variada (alcoholes de cadena corta, aminas o moléculas débilmente anfifílicas) (Aboofazeli y cols., 1994).

Estos sistemas dispersos fueron descritos por primera vez en 1942 por Schulman y Hoar (Hoar y Schulman, 1942) siendo inicialmente denominados, por muchos investigadores, como soluciones micelares hinchadas, emulsiones transparentes, micelas solubilizadas, etc. El término microemulsión fue introducido también por Schulman en 1959 (Schulman y cols., 1959) y es la denominación que ha prevalecido hasta la actualidad.

El nombre "microemulsión" se queda a veces restringido a sistemas en los que las gotículas que lo componen son de un tamaño lo suficientemente grande como para que las propiedades físicas del aceite disperso o de la fase acuosa sean indistinguibles de las correspondientes al aceite o agua por separado.

Sobre estas bases, es posible distinguir, al menos en un principio, microemulsiones óleo-acuosas, en las que las gotículas tienen un núcleo oleoso isotrópico, de sistemas micelares que contengan pequeñas cantidades de fases oleosa solubilizadas incapaces, juntos con las porciones lipófilas del tensioactivo, de producir un núcleo isotrópico. Sin embargo, debido a que no existe un método sencillo para determinar el contenido en aceite que permita al núcleo de las "micelas hinchadas" adquirir las mismas propiedades que la fase por separado, la distinción entre sistemas micelares solubilizados y microemulsiones no está delimitada con claridad.

3.4.2.-Diferencias entre la microemulsión y otros sistemas dispersos coloidales

Aunque el término microemulsión se puede asociar al de emulsión, existen notables diferencias entre ambas dispersiones coloidales.

- Una diferencia esencial entre emulsiones y microemulsiones, radica en la espontaneidad de formación de las segundas, que, a diferencia de las emulsiones, no requieren un gran aporte de trabajo mecánico en su formación. Esta es una distinción muy importante entre los dos sistemas. Si hiciéramos una revisión bibliográfica sobre patentes, encontraríamos varias "microemulsiones" cuya obtención sólo es posible con sonicación prolongada o con la utilización de técnicas de microfluidificación, y por lo tanto, inaceptables como tales si nos ceñimos a la definición generalizada de estos sistemas.

- Otra diferencia muy relevante entre ambos sistemas dispersos hace referencia a la transparencia de las microemulsiones, la cuál tiene su origen en el pequeño diámetro de las gotículas que componen sus fase dispersa, y que suele ser menor de 140 nm. Debido a esta particularidad, las microemulsiones dispersan débilmente la luz visible que incide sobre ellas, en comparación con la dispersión que producen las gotículas (1-10 μm) de las emulsiones convencionales.

- Finalmente, la diferencia quizás más importante desde el punto de vista farmacéutico y de formulación, se encuentra en las diferencias existentes en la estabilidad de ambas dispersiones. Así, mientras que las emulsiones envejecen debido a los fenómenos de coalescencia y de Ostwald (transferencia de materia de las gotículas pequeñas a las grandes), con la consiguiente disminución de la superficie interfacial y por tanto, de la energía libre del sistema, en las microemulsiones, la tensión interfacial es lo suficientemente baja como para compensar la entropía de la dispersión, siendo estos sistemas termodinámicamente estables.

- Por otra parte, se han identificado las microemulsiones con las soluciones micelares. Sin embargo, las microemulsiones se diferencian de las soluciones micelares por su mayor capacidad de solubilización con un mínimo aumento en el tamaño de gota.

3.4.3.-Teoría sobre la formación de microemulsiones

- Formación de una tensión interfacial negativa: fue propuesta inicialmente por Schulman y cols. (Schulman y cols., 1948; Schulman y Riley, 1948). Se consideraba que la formación espontánea de las gotículas de la microemulsión era debida a la formación de una película compleja en la interfaz aceite-agua por el tensioactivo y el co-tensioactivo. Esto causaba una reducción en la tensión interfacial a valores muy bajos (de próximos a cero hasta negativos).

La película interfacial mixta en equilibrio tanto con la fase acuosa como la oleosa, era considerada doble y de naturaleza líquida con una presión de expansión bi-dimensional, π_i , que determinaba la tensión interfacial, γ_i , de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\gamma_i = \gamma_{0/w} - \pi_i$$

donde $\gamma_{0/w}$ representa la tensión interfacial aceite/agua en ausencia de la película.

Cuando grandes cantidades de tensioactivo y co-tensioactivo se absorben para formar la interfaz, la presión de expansión, podría hacerse mayor a la tensión interfacial dando como resultado una presión interfacial negativa y por tanto, energía libre disponible para reducir la superficie interfacial.

Posteriormente, Prince (Prince, 1970; Prince 1975) postuló que la tensión interfacial negativa podría producirse como consecuencia de una disminución de $\gamma_{0/w}$, en lugar de una irreal presión inicial alta como aparecía en el modelo original.

Esta disminución podría deberse al posicionamiento del co-tensioactivo entre la fase oleosa y la interfaz. La película interfacial debe curvarse para la formación de las gotículas, y, por tanto, el concepto de una doble película se utilizó para explicar tanto la estabilidad del sistema como la curvatura de la interfaz. Una película doble y plana estaría sometida a presiones debidas a las diferentes tensiones existentes a cada uno de sus lados. La reducción de este gradiente de tensiones al igualarse las presiones a ambos lados de la superficie es lo que provocaría la curvatura de la película, tal y como puede apreciarse en la figura 15.

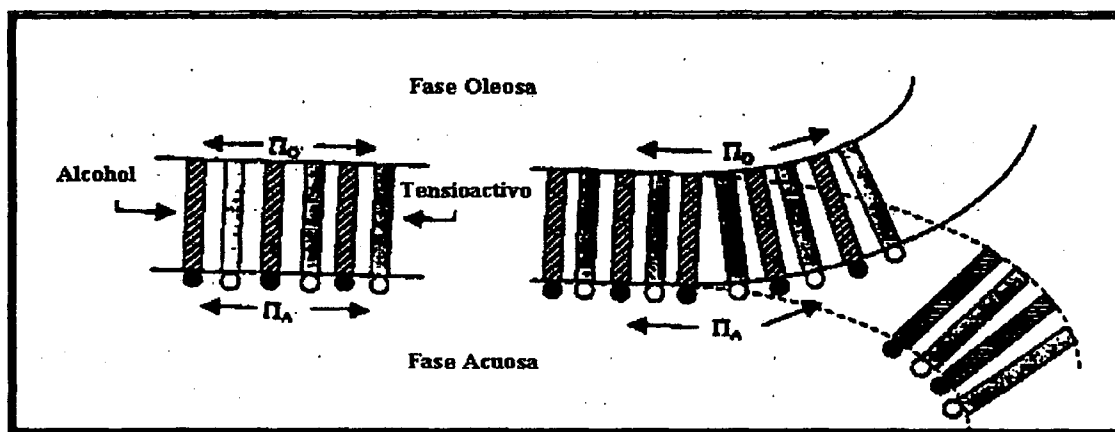


Figura 15. Formación de la curvatura de la superficie interfacial de las microemulsiones.

El papel dinámico que juega el co-tensioactivo en la formación de microemulsiones fue considerado por Gerbacia y Rosano (1973), quienes observaron que la tensión interfacial podría reducirse temporalmente debido a la difusión del co-tensioactivo a través de la interfaz. Propusieron que las microemulsiones se formaban por un doble proceso de dispersión y estabilización. El proceso de dispersión implica una reducción transitoria de la tensión interfacial a valores negativos o próximos a cero a los cuales la interfaz se expande para formar pequeñas gotículas dispersas. Como consecuencia, éstas absorben más tensioactivo y co-tensioactivo hasta que la fase inicial está lo suficientemente disminuida como para que γ_i tome nuevamente valores positivos; momento en el cual, se inicia la etapa de estabilización por la película interfacial de tensioactivo y co-tensioactivo.

- Teoría de solubilización: Shinoda (Shinoda y Kunieda, 1973; Shinoda y Lindman, 1987) y Frieberg (Frieberg y Venable, 1983; Frieberg y cols., 1977) consideran a las microemulsiones como soluciones monofásicas termodinámicamente estables de micelas esféricas hinchadas con agua o con aceite.

Frieberg demostró que en soluciones de micelas inversas se podía solubilizar tales cantidades de fase oleosa, que la composición de la solución resultante podía considerarse como una microemulsión.

3.4.4.-*Diagramas de fases*

Cuando los distintos elementos de los que se compone una microemulsión (fase acuosa, fase oleosa, tensioactivo y co-tensioactivo), se mezclan, dicha microemulsión es sólo una de las múltiples estructuras de asociación (incluidas emulsiones convencionales, fases micelares y mesomórficas de múltiples construcciones tales como lamelares, hexagonales, cúbicas, gran variedad de geles y dispersiones oleosas) que pueden formarse, en función de la naturaleza química y concentración de cada uno de los componentes, así como de la temperatura y presiones prevalecientes en cada momento.

Una aproximación muy útil para ilustrar la serie tan compleja de interacciones que ocurren cuando se mezclan los componentes en distintas proporciones, es la construcción de diafragmas de fases.

Como se puede observar en la figura 16, puede emplearse un tetraedro regular compuesto por cuatro triángulos equiláteros para trazar la composición sistemas de cuatro componentes, con los componentes puros representados en cada uno de los vértices del tetraedro siendo los lados del mismo mezclas binarias de dichos componentes. Sin embargo, los diagramas cuaternarios son muy laboriosos de preparar y difíciles de interpretar, es por ello, por lo que en la práctica es mucho más habitual investigar secciones planas (área sombreada de la figura anterior) del tetraedro trazando un diagrama triangular bidimensional (diagrama de fases pseudo-ternario), bien manteniendo fija la proporción de uno de los componentes, o bien utilizando una relación constante de dos de ellos, generalmente del tensioactivo y del co-tensioactivo.

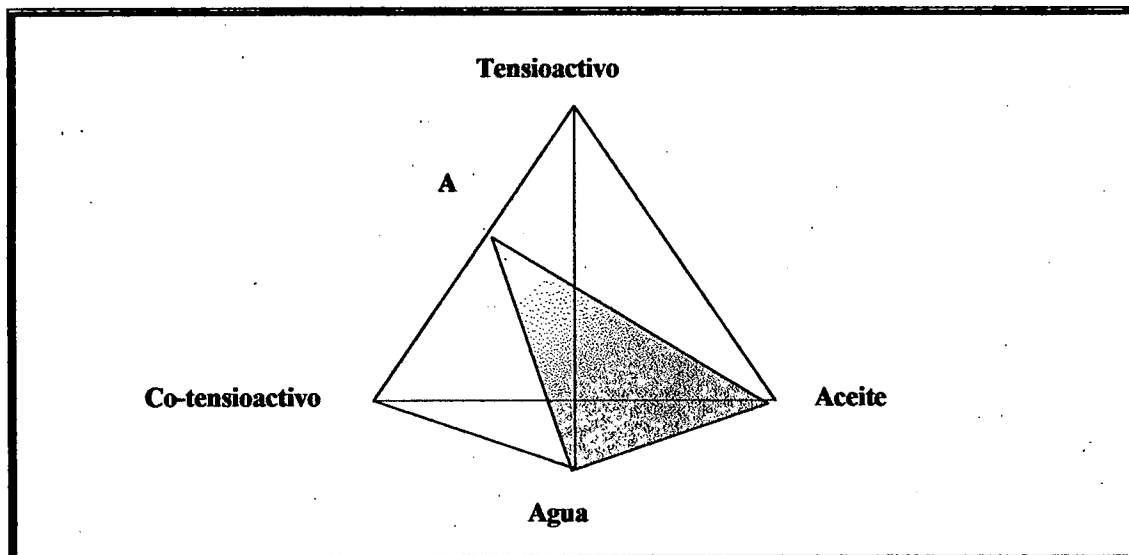


Figura 16. Diagramas de fases cuaternario para sistemas de cuatro componentes.

La figura 17, representa esquemáticamente un diagrama de fases pseudo-ternario con una proporción constante entre tensioactivo y co-tensioactivo, y muestra microemulsiones y estructuras lamerales y micelares asociadas.

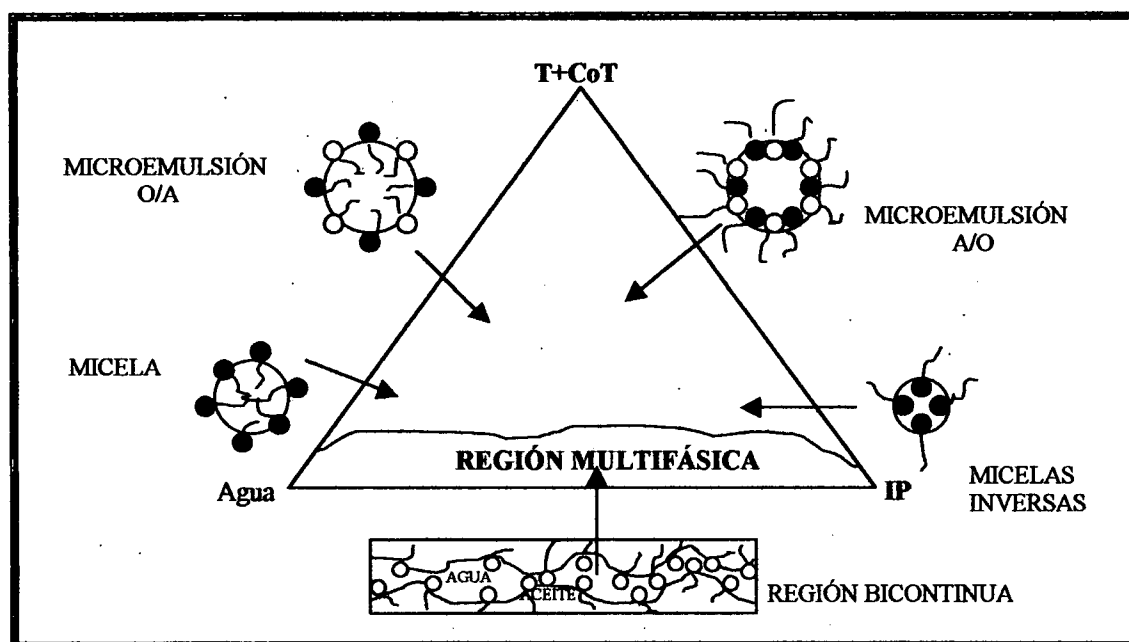


Figura 17. Modelo teórico de diagrama de fases pseudo-ternario.

Los dominios correspondientes a las microemulsiones, que pueden ser regiones de una o múltiples fases (área sombreada), se encuentran cerca de la zona central de diagrama, en áreas que contienen comparativamente grandes proporciones de tensioactivo. Esto trae como consecuencia un problema importante a la hora de utilizar estos sistemas como formas de administración de fármacos, ya que la mayoría de los tensioactivos a concentraciones elevadas son irritantes y tóxicos.

Las microemulsiones pueden también coexistir en equilibrio con exceso de fase acuosa, oleosa, o ambas. Los dominios multifásicos de las microemulsiones también tienen importancia práctica. Estos sistemas en equilibrio han sido denominados como Tipo I, Tipo II ó Tipo III después de su primera descripción por Winsor (Winsor, 1948). Los sistemas de Winsor Tipo I consisten en una pequeña fase de microemulsión o/a coexistente con exceso de fase oleosa, mientras que los sistemas Tipo II están constituidos por una elevada fase de microemulsión a/o en equilibrio con un exceso de fase acuosa. Finalmente, los sistemas Tipo III se forman cuando el tensioactivo(s) se encuentra concentrado en una fase intermedia bi-continua rica en tensioactivo, la cuál coexiste con exceso de fase acuosa y oleosa.

El tipo de equilibrio en estos sistemas depende de la concentración y naturaleza química del tensioactivo(s), fase oleosa y sustancia solubilizadas. Se pueden inducir rápidas transiciones entre los diferentes tipos de sistemas y entre las microemulsiones de fase única mediante cambios en la temperatura (cuando se usan tensioactivos no iónicos), cambios en la salinidad (por ejemplo fuerza iónica), o modificando la relación tensioactivo/co-tensioactivo (Robbins, 1976). Un método alternativo para la presentación de datos, es en forma de diagramas de fase pseudo-binarios. Esta aproximación ha sido extensamente utilizada por Shinoda y cols., quienes han llevado a cabo numerosas investigaciones sobre el comportamiento fásico de mezclas fase acuosa-fase oleosa-tensioactivo no iónico (Shinoda y Frieberg 1986; Shinoda y cols., 1991).

Los tensioactivos no iónicos, por lo general, no necesitan la presencia de un co-tensioactivo para formar microemulsiones. Con tales sistemas, la temperatura es el factor más importante ya que los tensioactivos no iónicos ven incrementada su lipofilia a medida que aumenta la temperatura.

Dado que los sistemas agua-aceite solubilizados presentan propiedades similares a bajas concentraciones de tensioactivo, es muy frecuente el uso de diagramas pseudo-binarios de fases en que se representan las fracciones de fase acuosa y oleosa, a un porcentaje en peso fijo del tensioactivo, en función de la temperatura. Esto implica un esfuerzo considerablemente menor que el de determinar diagramas ternarios a diferentes temperaturas.

En la siguiente figura, podemos observar un diagrama pseudo-binario de fases simplificado.

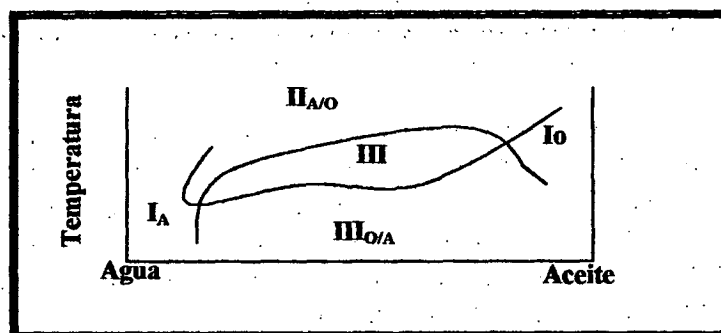


Figura 18. Diagrama de fase pseudo-binario.

Las regiones de fase única isotrópicas con concentraciones altas y bajas de fase acuosa, I_A y I_O , corresponden a microemulsiones o/a y a/o, respectivamente. La región de tres fases intermedia, III, representan un estado de transición entre las fases a/o y o/a; en esta región se localiza la Temperatura de Inversión de Fases (Phase Inversion Temperature ó PIT) del sistema.

En la parte inferior del diagrama, encontramos una región de dos fases $II_{o/a}$, compuesta de fase acuosa u oleosa con tensioactivo disuelto. Después de mezclarse, suele formarse una macroemulsión o/a. Del mismo modo, la región $II_{a/o}$, a altas temperaturas, representa una región de dos fases compuesta de fase acuosa y oleosa con tensioactivo disuelto que, tras agitación dan lugar a una macroemulsión a/o.

Aunque estos diagramas de fases pseudo-ternarios y binarios, se usan extensivamente en formulaciones para delimitar de una forma exacta las condiciones necesarias para la formación de microemulsiones, nos son capaces de predecir el equilibrio de fases o el tipo de sistema formado (o/a, a/o, bicontinuo, etc.) ni pueden indicar las condiciones de máxima estabilidad de los sistemas. Simplemente establecen los límites entre regiones de una o múltiples fases e ilustran el efectos que provocan los cambios en las concentraciones de los componentes, individual o colectivamente.

3.4.5.-Formulación de microemulsiones

Las microemulsiones suelen desarrollarse empíricamente, ya que no existe una teoría adecuada que permita predecir los compuestos a partir de los cuales puedan formarse. Su formulación implica normalmente una combinación de tres a cinco componentes: una fase oleosa, una fase acuosa, un tensioactivo primario, en muchos casos, un tensioactivo secundario (co-tensioactivo), y ocasionalmente un electrolito.

Estos sistemas isotrópicos, suelen presentar una mayor complejidad en su formulación que las emulsiones convencionales, debido a que su formación es un proceso muy específico que implica interacciones espontáneas entre las moléculas constituyentes. El tipo de estructura de asociación obtenida a partir de estos componentes a una temperatura determinada, no sólo depende de la naturaleza química de cada uno de ellos, sino también de sus concentraciones relativas.

- Elección de los componentes: aunque no existan unas reglas estrictas para la elección de los componentes más apropiados de una microemulsión, existen unas directrices generales basadas en observaciones empíricas (Rosano y cols., 1979; Rosano y cols., 1988; Osborne y cols., 1988;). El paso crucial, radica en la selección del tensioactivo y (si es necesario) del co-tensioactivo para cada tipo de fase oleosa. Debemos considerar que el tensioactivo(s) elegido debe:

- Disminuir la tensión interfacial a valores muy pequeños que ayuden al proceso de dispersión durante la preparación de la microemulsión.
- Constituir una película flexible que pueda formar con rapidez pequeñas gotículas esféricas.

- Tener un carácter hidrófilo-lipófilo aproximado para aportar la correcta curvatura a la región interfacial para el tipo de microemulsiones deseado, o/a, a/o, ó bicontinua.

Con respecto al primer punto mencionado, ya se comentó con anterioridad que una de las condiciones esenciales para la formación de una microemulsión es la obtención de una tensión interfacial muy baja. Este efecto casi nunca se consigue con el uso de un único tensioactivo y casi siempre se requiere la adición de un co-tensioactivo. La presencia de un alcohol de cadena corta puede reducir la tensión interfacial de valores del orden de 10 mN/m (en sistemas que contengan sólo tensioactivos) a valores menores de 10^{-2} mN/m.

Se pueden observar excepciones a esta regla cuando se utilizan tensioactivos no iónicos, los cuales presentan a su PIT tensiones interfaciales muy bajas, del orden de 10^{-1} a 10^{-2} mN/m (Aveyard y cols., 1989). Este fenómeno, explica la causa por la cual los tensioactivos no iónicos pueden formar con frecuencia microemulsiones a su PIT, en un intervalo muy amplio de composiciones. Así, generalmente a temperaturas inferiores a la PIT, cualquier tipo de microemulsión formada a partir de un tensioactivo no iónico, será del tipo o/a, mientras que las formadas por encima de la PIT serán del signo contrario. Es fundamental tener en cuenta que la PIT de un sistema depende en gran medida de su fase oleosa, el tensioactivo(s) y los aditivos que pudieran estar presentes en él.

En referencia al segundo punto antes expuesto, el requerimiento de la formación de una película interfacial fluida se consigue, en la mayoría de los casos, mediante la adición de un co-tensioactivo. Así por ejemplo, en ausencia de un co-tensioactivo, las lecitinas forman microemulsiones a/o únicamente en un intervalo de concentraciones muy limitado, debido en parte a la tendencia que tienen de formar películas muy rígidas (Binks y cols., 1989).

La presencia de un co-tensioactivo de cadena corta confiere a la película interfacial la flexibilidad suficiente para adquirir las diferentes curvaturas requeridas para la formación de microemulsiones en un amplio intervalo de composiciones. En el caso de los tensioactivos no iónicos, la película interfacial flexible puede conseguirse simplemente con un aumento en la temperatura del sistema. Una implicación evidente que surge de la necesidad de la película interfacial, hace referencia a la longitud de las cadenas hidrófobas de los tensioactivos.

Así, para lograr la flexibilidad de la película, dichas cadenas no deben ser muy largas; si fuera necesario el uso de un tensioactivo de cadena hidrófoba larga, sería necesario que dicho tensioactivo tuviera suficientes grupos fluidificantes (por ejemplo insaturaciones) que asegurasen el estado líquido de las cadenas hidrófobas que lo constituyen.

Finalmente, en las siguientes tablas se resumen algunos de los problemas que pueden derivarse del uso de determinados componentes en la formulación de microemulsiones:

Componente	Posible Consecuencia
<u>Aceites polares</u>	Impedir la formación de microemulsiones.
<u>Aceites con bajo peso molecular</u>	Alterar la solubilización de fármacos en la región interfacial.
<u>Co-tensioactivos</u>	Impedir la dilutabilidad de la microemulsión.
<u>Presencia de electrolitos, tampones otros aditivos</u>	Afectar a la estabilidad y alterar el área de formación de las microemulsiones.
<u>Fármacos con propiedades tensioactivas</u>	Alterar el área de existencia del sistema y causar cambios de fase después de su liberación.
<u>Tensioactivos con cadena alquílica larga</u>	Impedir la formación de microemulsiones en un intervalo apropiado.

Tabla VII. Problemas causados por los distintos componentes de las microemulsiones.

- Construcción de los diagramas de fases: una vez que se han seleccionado los componentes más apropiados de la microemulsión, el siguiente paso es la construcción de los diagramas de fases cuaternarios o pseudo-ternarios que permitan definir la extensión y naturaleza de las regiones de formación de las microemulsiones y los dominios bi- ó tri-fásicos que las rodean.

Para desarrollar estos diagramas, se deben preparar un gran número de muestras de distintas composiciones. Las regiones correspondientes a microemulsiones se delimitan en función de su naturaleza isotrópica y baja viscosidad.

Existen varios procedimientos utilizados para la obtención de microemulsiones; así, por ejemplo, tenemos el de Bowcott y Schulman (Eccleston, 1994), que proponen inicialmente la obtención de una emulsión grosera mediante la adición de la mezcla fase oleosa-surfactante a parte de la fase acuosa, en un reactor a temperatura controlada. Posteriormente se valora este sistema volumétricamente hasta su claridad con el co-tensioactivo y, finalmente, se procede a su dilución con agua hasta obtener una microemulsión con la concentración deseada. Cuando se trabaja con tensioactivos no iónicos, los diagramas pseudo-binarios son muy útiles para observar la influencia que tiene la temperatura y la composición sobre los sistemas.

Rosano y cols. (1979) sugieren una rutina sencilla para una evaluación rápida de la adecuación de los componentes en la formación de microemulsiones, sin construir diagramas de fases. Esta técnica implica un cálculo simple para determinar la concentración mínima de tensioactivo requerida para cubrir la interfaz; posteriormente, se prepara una emulsión grosera, que se valora volumétricamente hasta total claridad con el co-tensioactivo elegido. Si el sistema no adquiere claridad tras la adición de una cantidad de co-tensioactivo equivalente al tensioactivo primario, se le considera inaceptable, y primero el co-tensioactivo, luego el tensioactivo y por último la fase oleosa se cambian de una manera lógica.

3.4.6.- *Estructura y caracterización de las microemulsiones*

- **Estructura:** como resultado de las investigaciones que se han realizado en los últimos años, se puede afirmar que las microemulsiones no se ajustan a un solo modelo estructural. Las estructuras más conocidas de las microemulsiones son las basadas en microgotas esféricas de tamaño uniforme de una de las fases en el seno de la otra.

En la figura 19, pueden observarse las dos estructuras opuestas. En la de tipo directo (o/a), las moléculas de tensioactivo se sitúan con la cadena hidrofóbica hacia el interior, lo cual crea un medio interno apolar que permite la solubilización de compuestos lipófilos. En las de tipo inverso (a/o), las cabezas polares se dirigen hacia el interior de la estructura formándose un medio polar que favorece la solubilización de agua o compuestos hidrófilos en su interior.

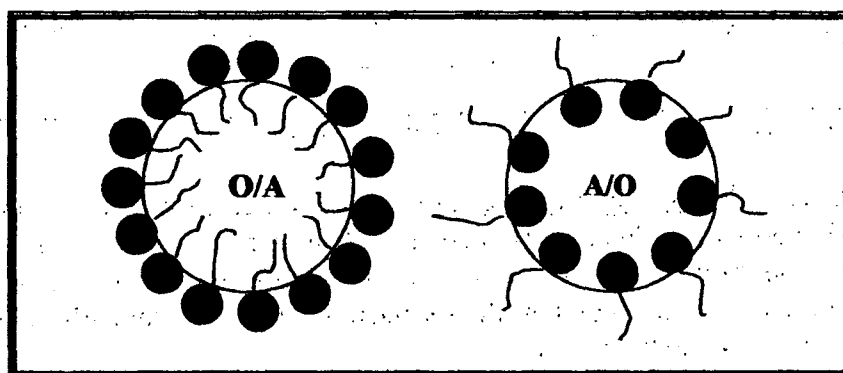


Figura 19. Estructuras típicas en microgota de las microemulsiones.

Además de estas dos estructuras, se han propuesto un gran número de estructuras bicontinuas o en forma de esponja, las cuales no han sido totalmente identificadas. Al aumentar la concentración de fase acuosa o bien la temperatura, se produce una transición de las microemulsiones inversas (a/o) a microemulsiones directas (o/a), pasando por una serie de estructuras bicontinuas que pueden presentar birrefringencia, tal y como puede apreciarse en la siguiente figura:

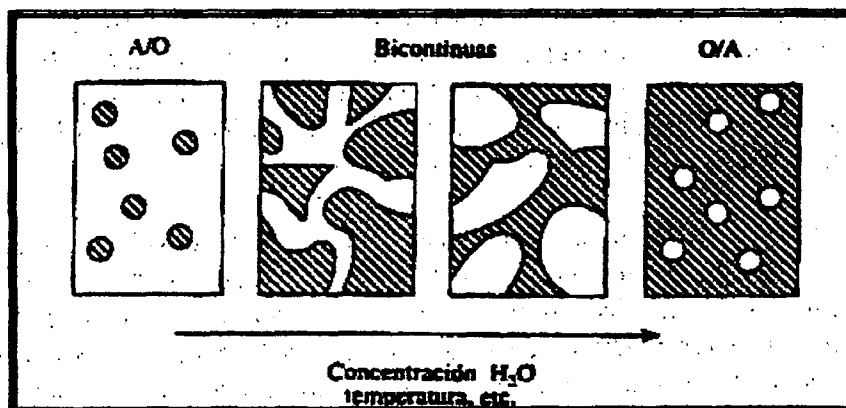


Figura 20. Tipo de posibles estructuras bicontinuas de transición de las microemulsiones

- **Técnicas de caracterización:** la caracterización de la estructura de las microemulsiones se realiza mediante diversas técnicas experimentales. En las

microemulsiones que presentan estructuras tipo a/o y o/a, se caracteriza el tamaño y forma de las gotículas así como las interacciones entre ellas.

En las bicontinuas, existen diversos parámetros para su caracterización como, por ejemplo, la distancia promedio máxima entre dos dominios acuosos o lipófilos. Asimismo, es importante estudiar la influencia de diversos parámetros, tales como la estructura de las moléculas de tensioactivo o del componente lipófilo, la temperatura, composición y la naturaleza de aditivos (alcoholes, electrolitos, etc.). No obstante, dada la complejidad de estos sistemas, los resultados obtenidos a partir de una sola técnica, generalmente no son suficientes para caracterizar de un modo inequívoco un sistema en forma de microemulsión.

Por todo ello, generalmente es necesaria la comprobación o el apoyo de varias técnicas, siendo las más destacables las siguientes:

a) Diagramas de fases: son indispensables en el estudio de las microemulsiones. Los límites de las zonas de una fase se pueden obtener mediante la observación directa de mezclas de composición conocida. La información obtenida puede complementarse con la observación microscópica con luz polarizada, que permite diferenciar las fases anisótropas de las isotrópicas.

b) Determinación de tensiones interfaciales: son importantes, ya que este parámetro es uno de los factores principales en la estabilidad de las microemulsiones. Para determinar estos valores extraordinariamente bajos de tensión interfacial (del orden de 10^{-3} mN/m) se requieren técnicas experimentales muy específicas. En este sentido la técnica más adecuada es la de la gota giratoria (Spinning drop).

c) Técnicas de difusión: dichas técnicas incluyen la difusión estática y dinámica de la luz, difusión de rayos X a ángulo pequeño y difusión de neutrones. Estas técnicas de difusión no sólo proporcionan la información estructural de la microemulsión, sino también permiten determinar las interacciones entre las gotículas de la fase interna, que pueden influir en la estructura y propiedades de las microemulsiones. Sin embargo, estas técnicas tienen algunas limitaciones, puesto que para la interpretación de los resultados se requiere el ajuste a un modelo teórico. Asimismo, en algunas de ellas es necesario diluir la muestra para reducir las interacciones entre las partículas.

d) Viscosidad: Las medidas reológicas permiten reducir las formas de los agregados, pues si son esféricos muestran mayor resistencia a fluir. Para la mayoría de las microemulsiones cuya viscosidad es similar a la del agua se cumple la ecuación de Einstein:

$$\eta_r = 1 + 2,5 \phi$$

siendo η_r la viscosidad relativa y ϕ la fracción en volumen de las partículas.

e) Conductividad eléctrica: De modo similar a las emulsiones, a las microemulsiones del tipo o/a les corresponde una elevada conductividad, mientras que la de las microemulsiones a/o es baja. No obstante, al diluir las microemulsiones a/o

pueden mostrar un aumento pronunciado de conductividad, indicativo del intercambio de iones entre las gotículas, que es el llamado “fenómeno de precolación”.

f) Resonancia magnética nuclear (RMN): Mediante medidas del coeficiente de autodifusión se obtiene información del estado o localización de las moléculas en una microemulsión y de la existencia de estructuras de tipo directo, inverso o bicontinuas o de interfaces deformables y flexibles con un tiempo corto de vida media.

Además de estas técnicas, también son de interés, para conocer la estructura de las microemulsiones, las siguientes: sedimentación y ultracentrifugación, microscopía electrónica, métodos de fluorescencia estática y dinámica, birrefringencia eléctrica, videomicroscopía (VEM), etc.

3.4.7.- *Estabilidad de las microemulsiones. Estudios de estabilidad*

- Estabilidad termodinámica: Basándose en modelos simplificados, se han desarrollado diversas teorías para explicar la estabilidad termodinámica de las microemulsiones. Sin embargo, ninguna de ellas ha resultado totalmente satisfactoria.

En los primeros tratamientos, se consideraba que la tensión interfacial era el factor dominante en la estabilidad de las microemulsiones. Sin embargo, se comprobó que otros factores desempeñan un papel igualmente importante. Ruckenstein y cols. (1985) y Overbeek (1986), desarrollaron modelos para explicar la estabilidad termodinámica de las microemulsiones donde se considera la existencia de microgotas monodispersas distribuidas al azar en el seno de una fase líquida. En su tratamiento, Ruckenstein expresó el cambio de energía libre de formación de una microemulsión, $\Delta GM(R)$, mediante la contribución de tres términos principales:

$$\Delta GM_{(R)} = \Delta G_1 + \Delta G_2 + \Delta G_3$$

donde:

ΔG_1 = Incremento de la energía interfacial.

ΔG_2 = Incremento de la energía libre de interacción entre las gotas.

ΔG_3 = Incremento de entropía del proceso de dispersión de las gotas de la microemulsión.

La energía libre de interacción entre las gotas, ΔG_2 , depende de un término negativo, debido a la atracción de Van der Waals y de un término positivo debido a la repulsión electrostática. Se comprobó que el término debido a las fuerzas de atracción de Van der Waals era insignificante en comparación a los otros términos.

En el tratamiento desarrollado por Ruckenstein se puso de manifiesto que la formación espontánea de una microemulsión puede producirse sólo si la tensión interfacial es tan baja que la energía libre de la interfase recién creada puede compensarse por la entropía de dispersión de las gotas en el medio.

La estabilización de las microemulsiones requiere que el tensioactivo posea un balance hidrófilo-lipófilo adecuado. Ello se puede conseguirse con:

- Un tensioactivo no iónico en un intervalo de temperaturas adecuado.
- Una combinación de tensioactivo hidrófilo (HLB alto) generalmente de carácter iónico, con un compuesto anfifilo hidrófobo (HLB bajo) denominado co-tensioactivo, que es generalmente un alcohol de longitud de cadena intermedia.
- Un tensioactivo iónico de doble cadena hidrófoba, como por ejemplo el dioctil sulfosuccinato sódico (AOT).

- Estabilidad durante el almacenamiento: los test de estabilidad durante el almacenamiento son más simples y requieren una menor frecuencia que en el caso de los sistemas dispersos groseros, en los que los cambios en el tamaño de las gotículas y de fases deben ser vigilados. Por ejemplo, si los tests de temperatura y congelación-descongelación, indican que el sistema se recupera con rapidez, la microemulsión es termodinámicamente estable en estas condiciones y no requiere de estudios frecuentes durante su almacenamiento, a menos que ocurran reacciones químicas (oxidaciones, variaciones de pH) que cambien la naturaleza de los componentes y por tanto de la microemulsión.

- Estudios de estabilidad: los estudios de estabilidad de las microemulsiones, se realizan frente a la temperatura. No existe un acuerdo entre los distintos autores acerca de cual debe ser el protocolo a seguir para realizar los estudios de estabilidad de estos sistemas; así, se nos presentan distintas propuestas:

- Seis semanas a 40°C y posteriormente alternar ciclos a 5 y 45°C.
- Cuatro semanas a 50°C, un mes a -5°C y ciclos entre 0 y 40°C. Comprobar que la temperatura del estudio está por debajo del PIT.
- Varios meses a 25°C, 40°C y cinco ciclos congelación-descongelación entre 23°C (8 horas) y -10°C (16 horas).
- Tres meses a 45°C, un mes a 60°C, 7 días a 80°C y cinco ciclos congelación-descongelación entre -15°C (24 horas) y 20°C (24 horas).
- Tres meses a 40°C, 1 semana a -5°C y ciclos de 40 y -5°C a intervalos de 24 horas. Realizar el test de centrifugación a 10.000 r.p.m. durante 10 minutos.

Finalmente, en la tabla VIII, podemos observar algunos de los estudios propuestos y los parámetros que se evalúan en cada uno de ellos, en función del tiempo de duración del estudio y de las condiciones de temperatura empleadas en el desarrollo de los mismos:

Tiempo de Duración del Ensayo	7 Días	30 Días	12 Meses	60 Días	30 Días
Temperatura	- 18°C +40°C	4°C	20°C	40°C	75°C
Parámetros					
Aspecto	X	X	X	X	X
pH	X	X	X	X	X
Viscosidad	X	X	X	X	X
Test Centrifugación	—	X	X	X	X
Índice de Refracción	X	X	X	X	X
Densidad	—	X	X	X	X
Signo de la Microemulsión	—	X	X	X	X
Tamaño de las Gotículas	—	—	X	—	—

Tabla VIII.- Protocolos para la evaluación de la estabilidad de las microemulsiones.

3.4.8.- Microemulsiones como sistemas de liberación de fármacos

En los últimos diez años, las microemulsiones han adquirido un considerable interés como sistemas potenciales de liberación de fármacos (Burgess, 1994), ya que presentan grandes ventajas sobre los sistemas coloidales en período de investigación así como sobre las emulsiones convencionales, suspensiones y soluciones micelares (Bhargava y cols., 1987). Parte de este interés reside en su capacidad de disolver cantidades considerables de sustancia liposolubles, hidrosolubles y anfifílicas debido a sus extensas superficies acuosas, oleosas e interfaciales. Así mismo, presentan la ventaja de ser fáciles de producir; se forman de manera espontánea y sus microestructuras son independientes del orden de incorporación de los excipientes. Su transparencia óptica y baja viscosidad, confieren a las microemulsiones una buena apariencia externa y un fácil manejo, y su estabilidad indefinida asegura una vida media muy prolongada.

A pesar de todas estas ventajas, todavía no se ha definido la amplitud de uso de las microemulsiones dentro del campo farmacéutico. Las mayores limitaciones al uso de las microemulsiones como sistema de liberación de fármacos, radican en el reducido número de excipientes (tensioactivos, co-tensioactivos, solventes, etc.), aceptables desde el punto de vista farmacéutico. Hasta el momento actual, la mayoría de los trabajos publicados sobre estos sistemas, han contemplado el uso, como co-tensioactivos, de alcoholes de cadena corta y aminas, sustancias ciertamente tóxicas e inaceptables para el consumo farmacéutico.

Muchos de los vehículos oleosos empleados hasta ahora, son hidrocarburos alifáticos, tales como el hexano o el benceno, que obviamente no son apropiados para las formulaciones farmacéuticas debido, también, a su elevada toxicidad para el ser

humano. Como consecuencia del creciente interés surgido en los últimos años en la comunidad científica por estos sistemas como vehículos potenciales de fármacos, se ha llevado a cabo cierto número de estudios relativos al uso de tensioactivos no iónicos menos tóxicos (Malcolmson y Lawrence, 1993) y lecitinas, tensioactivos anfóteros y biocompatibles (Aboofazeli y Lawrence, 1993; Attwood y cols., 1992; Saint-Ruth y cols., 1995).

En las tablas IX y X, podemos ver las ventajas derivadas de la utilización de las microemulsiones en el campo farmacéutico, y los campos de aplicaciones en los que se está investigando, de acuerdo con los artículos publicados hasta la fecha.

- Liberación transdérmica de fármacos hidrofílicos y lipofílicos mediante el uso de microemulsiones a/o y o/a respectivamente.
- Liberación oral de péptidos mediante el uso de microemulsiones a/o.
- Formulación intramuscular de péptidos por medio de microemulsiones a/o.
- Liberación intraocular de fármacos en microemulsiones o/a.

Tabla IX. Investigaciones farmacéuticas en el campo de las microemulsiones.

Ventajas Generales	Ventajas Específicas	
	Microemulsiones a/o	Microemulsiones o/a
Facilidad de preparación	Protección de fármacos hidrosolubles.	Aumento de la solubilidad de fármacos lipofílicos.
Claridad	Liberación sostenida de fármacos hidrosolubles.	Aumento de la biodisponibilidad.
Estabilidad	Aumento de la biodisponibilidad.	Formulación concentrada de fármacos solubles en fase acuosa u oleosa.
Posibilidad de filtración (filtración esterilizante).		
Vehiculización de fármacos de diferente lipofilia en un mismo sistema.		
Baja viscosidad y gran manejabilidad.		

Tabla X. Ventajas derivadas de la aplicación farmacéutica de las microemulsiones.

- Microemulsiones como sistemas de administración transdérmica de fármacos:
la idoneidad de la utilización de las microemulsiones como sistemas de administración transdérmica de fármacos, se ha estudiado en los últimos años por numerosos autores mediante estudios "in vitro" de permeabilidad a través de la piel.

En un estudio realizado sobre el efecto de la formulación en la absorción percutánea de agua a partir de una microemulsión Aerosol[®]OT/octanol/agua, se demostró (Osborne y cols., 1988) que el flujo transdérmico del agua era enormemente dependiente del contenido en agua de la microemulsión. Dicho flujo se incrementó seis veces al aumentar el contenido en agua de la microemulsión, de 15 a 68%. A altos contenidos de agua, una mayor proporción de fase acuosa de la microemulsión se encuentra disponible para su transporte, llevando consigo un aumento en el flujo antes mencionado.

Février y cols., (1991) publicaron experimentos "in vitro" diseñados para simular la penetración percutánea de tirosina cuando se administraba en microemulsiones o/a. La liberación de tirosina radiomarcada a partir de este vehículo se comparó con su liberación a partir de cristales líquidos y emulsiones. Se observó que tanto las microemulsiones como los cristales líquidos promovían la penetración de la tirosina a través de la epidermis en comparación con las emulsiones. Sin embargo, también pudo observarse que los cristales líquidos, a diferencia de las microemulsiones, causaban un fuerte efecto irritante sobre la piel.

En un estudio realizado por Ziegenmeyer y Führer (1980), se pudo comprobar que las microemulsiones aumentaban la absorción percutánea de clorohidrato de tetraciclina en comparación con los sistemas convencionales. La explicación a este fenómeno puede encontrarse en el hecho de que las microemulsiones constituyen mejores reservorios que los sistemas convencionales, para fármacos con baja solubilidad, debido a su gran capacidad de solubilización. Así, si el fármaco se encuentra disuelto en lugar de suspendido, su absorción será más rápida y eficaz.

Uno de los problemas asociados a la utilización de microemulsiones para la liberación tópica de fármacos, hace referencia a la dificultad de aplicación de estos vehículos sobre la piel como consecuencia de su baja viscosidad y alta fluidez. En respuesta a este problema, Gasco y cols. (1991), desarrollaron una microemulsión de ácido azelaico a la que confirieron la viscosidad adecuada para su aplicación transdérmica adicionando Carbopol[®]934 a su formulación.

Finalmente, algunos fármacos (timolol, propanolol, etc.) son demasiado hidrófilos para incorporarse a la fase interna de sistemas o/a. Sin embargo, es posible incrementar la lipofilia de estos compuestos mediante la formación de pares iónicos con otras sustancias como, por ejemplo, el ácido octanoico (Gasco y cols., 1988). Las constantes de difusión del fármaco a partir de la microemulsión disminuyen por lo general a medida que se incrementa la concentración de ácido octanoico. Esta particularidad, ofrece una clara posibilidad de modular la liberación de principios activos de distinta naturaleza química, con una simple variación del efecto producido por el contra-ión empleado.

- Microemulsiones como vehículos para la liberación oral de fármacos: los estudios realizados sobre las microemulsiones para la administración oral, se han centrado alrededor de su potencial como sistemas de liberación de péptidos y, en particular, de ciclosporina.

Uno de los trabajos que más ha contribuido en este aspecto fue el desarrollado por Tarr y Yalkowsky (1989), quienes demostraron que una disminución en el tamaño de la gotícula de la microemulsión, aumentaba la absorción intestinal de la ciclosporina en ratas; fenómeno que se explicó por la gran superficie específica del sistema disperso.

En un estudio más detallado, Ritschel (1993) investigó la absorción intestinal de tres péptidos disueltos en la fase acuosa, a pH adecuado, de la microemulsión. En el estudio se emplearon tres formas distintas de microemulsión, una fluida, otra en forma de gel y, por último, una microemulsión en forma de gel microencapsulada. Cuando estas formulaciones se administraron oralmente, se observó que el aumento en la biodisponibilidad de los péptidos no se debía únicamente al tamaño de las gotículas de la fase interna.

De las conclusiones extraídas por el autor en este trabajo, se dedujo que la absorción gastrointestinal de moléculas a partir de microemulsiones, dependen de los siguientes factores de la formulación:

- Tipo de fase oleosa de la microemulsión.
- Digestibilidad de dicho compuesto lipídico.
- Naturaleza de los tensioactivos empleados en la microemulsión.

PARTE EXPERIMENTAL

CAPÍTULO IV. ESTUDIOS Y CARACTERIZACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO

IV.- ESTUDIOS Y CARACTERIZACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO

4.1.- Métodos analíticos cualitativos

4.1.1.- Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El fundamento de la calorimetría diferencial de barrido (DSC) consiste en medir el flujo de calor absorbido o emitido por una sustancia cuando es sometida a un aumento gradual de la temperatura. Con esta técnica se puede detectar procesos endotérmicos como la fusión, la sublimación, la vaporización de una sustancia y también procesos exotérmicos como la cristalización, o la descomposición. Estos procesos ocurren a las mismas temperaturas para las mismas sustancias, por lo que el DSC se puede utilizar como método para la identificación de materias primas.

En esta técnica se calientan linealmente dos hornos; en uno de ellos se coloca la muestra a analizar dentro de una cápsula, y en el otro se sitúa una cápsula vacía de referencia. Si no se produce ningún cambio, ambas cápsulas se mantienen a la misma temperatura durante el calentamiento; sin embargo, cuando se produce un cambio como es la fusión, la energía aportada en el calentamiento es utilizada por la muestra para su fusión, por lo que la cápsula que la contiene permanece a temperatura constante durante el tiempo que dura dicho proceso. Existe una diferencia de temperatura entre la cápsula de muestra y la de referencia, que es registrada dando lugar al termograma. El equipo mide el flujo de calor en función del tiempo o de la temperatura.

- Método:

Los barridos calorimétricos del principio activo se realizan en un equipo Mettler TA8000. Las condiciones de realización de los barridos se muestran en el siguiente cuadro:

Condiciones	
Peso de las muestras	1,5-2,0 mg
Cápsulas	Aluminio cerradas
Atmósfera	Aire
Temperatura inicial	20°C
Temperatura final	200°C
Velocidad de calentamiento	10°C/min

Cuadro 1. Condiciones experimentales del análisis realizado mediante DSC.

Los termogramas representan el valor normalizado de la entalpía (Watio/gramo) (W/g) frente a la temperatura (°C).

- Resultados y comentarios:

El termograma obtenido para el nifedipino se recoge en la figura 1.

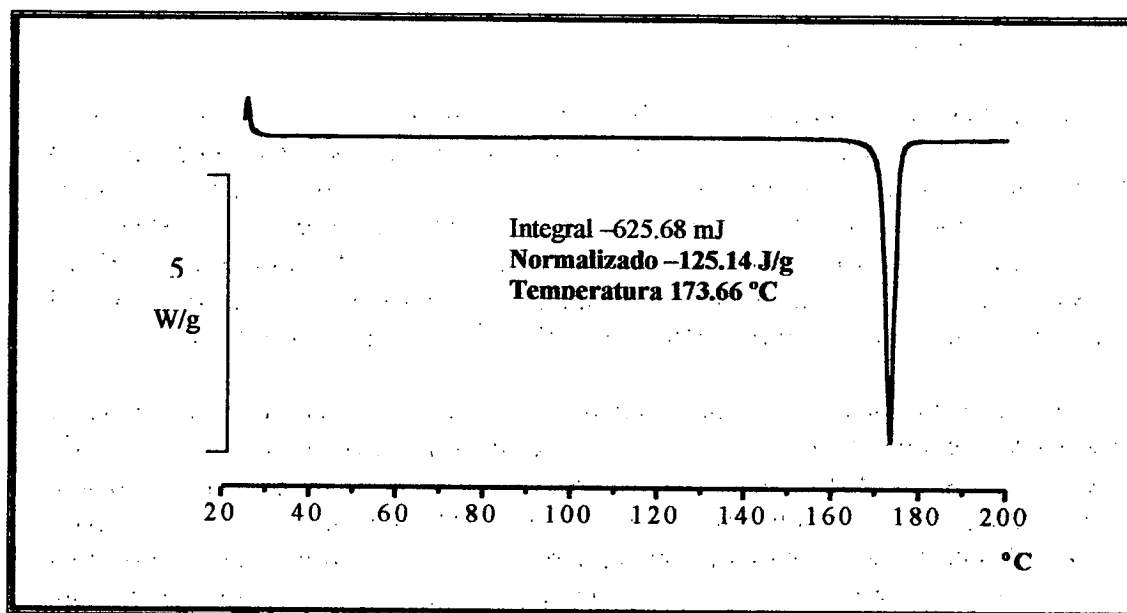


Figura 1. Termograma DSC del nifedipino.

En esta curva se observa un único pico endotérmico a 173,66°C correspondiente a la fusión del nifedipino con un valor de entalpía de fusión de 125,14 J/g, lo que nos indica que se trata de una sustancia cristalina. Tras la fusión, la línea base se recupera y permanece sin variaciones hasta aproximadamente 200°C. Esto es indicativo de que el nifedipino (materia prima) presenta una elevada estabilidad térmica.

4.1.2.- Difracción de rayos X (DRX)

Esta técnica se basa en la capacidad que tiene un cristal de difractar los rayos X que inciden sobre el mismo. Cuando una muestra constituida por una gran cantidad de microcristales orientados totalmente al azar se irradia con rayos X, se obtienen conos de difracción que pueden registrarse representando en el eje de abscisas el ángulo de Bragg (2 θ) y en el de ordenadas las intensidades difractadas.

Es un método cómodo y práctico para la identificación cualitativa de compuestos cristalinos, ya que el patrón de difracción de rayos X es único para cada sustancia cristalina. La identificación de un compuesto por su patrón de difracción del polvo se basa en la posición de las líneas y sus intensidades relativas.

- Método:

El siguiente difractograma se ha realizado en el Centro de Ayuda a la Investigación (CAI) de Difracción de Rayos X de la Universidad Complutense de

Madrid en su sede de la Facultad de Farmacia. El equipo utilizado en todos los análisis es un Philips modelo X-Pert.

Las condiciones de análisis para el difractograma son las siguientes:

Fuente de radiación	K α_1 del Cu
Barrido	Entre 5 y 40° T
Paso de ángulo	0,04°
Tiempo de paso	1 seg

Cuadro 2. Condiciones experimentales del ensayo de difracción de Rayos X.

El difractograma representa la intensidad de los picos en unidades Counts frente al ángulo 2T.

- Resultados y comentarios:

Como podemos observar en la figura 2, el nifedipino es una sustancia bastante cristalina ya que presenta en su difractograma picos agudos e intensos a distintos valores del ángulo 2T.

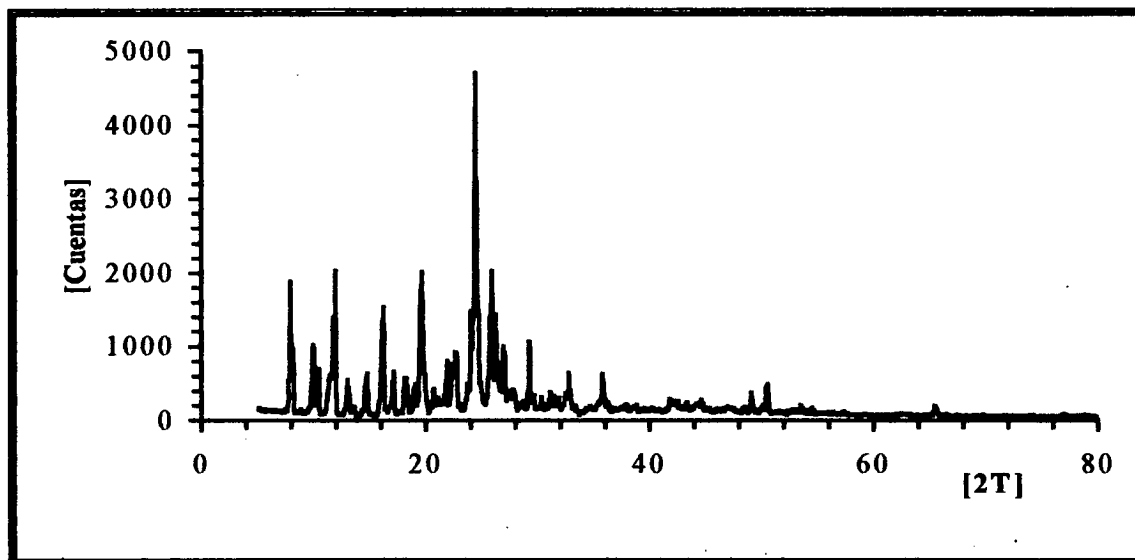


Figura 2. Difractograma del nifedipino.

Los resultados obtenidos por difracción de Rayos X confirman la sospecha de cristalinidad del principio activo, advertida en el análisis calorimétrico (ver apartado 4.1.1.), donde se observa un pico endotérmico de fusión bien definido característico de las sustancias con una naturaleza cristalina fuertemente marcada.

4.1.3.- Espectroscopia de absorción infrarroja

La finalidad de la aplicación de la espectroscopia infrarroja es la determinación de los grupos funcionales que contiene un material concreto. Como cada grupo funcional absorbe únicamente a unas determinadas frecuencias, características de la radiación infrarroja, una representación de la intensidad de la radiación frente a la frecuencia identificará a los grupos químicos reconocidos en la muestra.

El espectro infrarrojo de un compuesto orgánico es, por lo general, bastante complejo. Por este motivo no puede analizarse completamente. Sin embargo, una correspondencia "pico-por-pico" de los espectros infrarrojos de dos muestras diferentes constituye un excelente criterio de identidad.

Según lo comentado anteriormente, el espectro infrarrojo de una molécula orgánica no resulta conveniente analizarlo en su totalidad, pero puede obtenerse una información muy valiosa a partir del mismo, debido a que la mayoría de los grupos funcionales más corrientes dan lugar a bandas de absorción características en regiones definidas en la escala infrarrojo.

- Método:

Se utiliza un equipo Beckman AcculabTM 4. Mediante esta técnica se analizó el nifedipino (materia prima). Las muestras a analizar se dispersan al 0,5% en KBr comprimiendo la mezcla posteriormente.

Para la compresión de la mezcla se aplica en una prensa una fuerza 10 Kp/cm². Los comprimidos obtenidos presentan un diámetro de 13 mm. Se registra el espectro de absorción infrarrojo desde 4000 hasta 600 cm⁻¹. Cada espectro es el resultado de cuatro determinaciones (n=4).

- Resultados y comentarios:

El espectro de infrarrojo obtenido para el nifedipino (Figura 3) presenta las bandas características descritas en la bibliografía para este principio activo (Syed Laik Ali, 1989).

Como se puede observar en la tabla 1, estas bandas se encuentran localizadas a las siguientes longitudes de onda:

Frecuencia (cm ⁻¹)	Asignación	Frecuencia (cm ⁻¹)	Asignación
3331	NH	1574	
3102	CH-aromático	1530	NO ₂
2931,2842	CH-alifático	1433	
1689	C=O éster	1380	-C-CH ₃
1679		1227	
1625	-C=C-aromático	1121	-C-O-éster

Tabla 1. Longitudes de onda del espectro infrarrojo del nifedipino con sus correspondientes asignaciones estructurales.

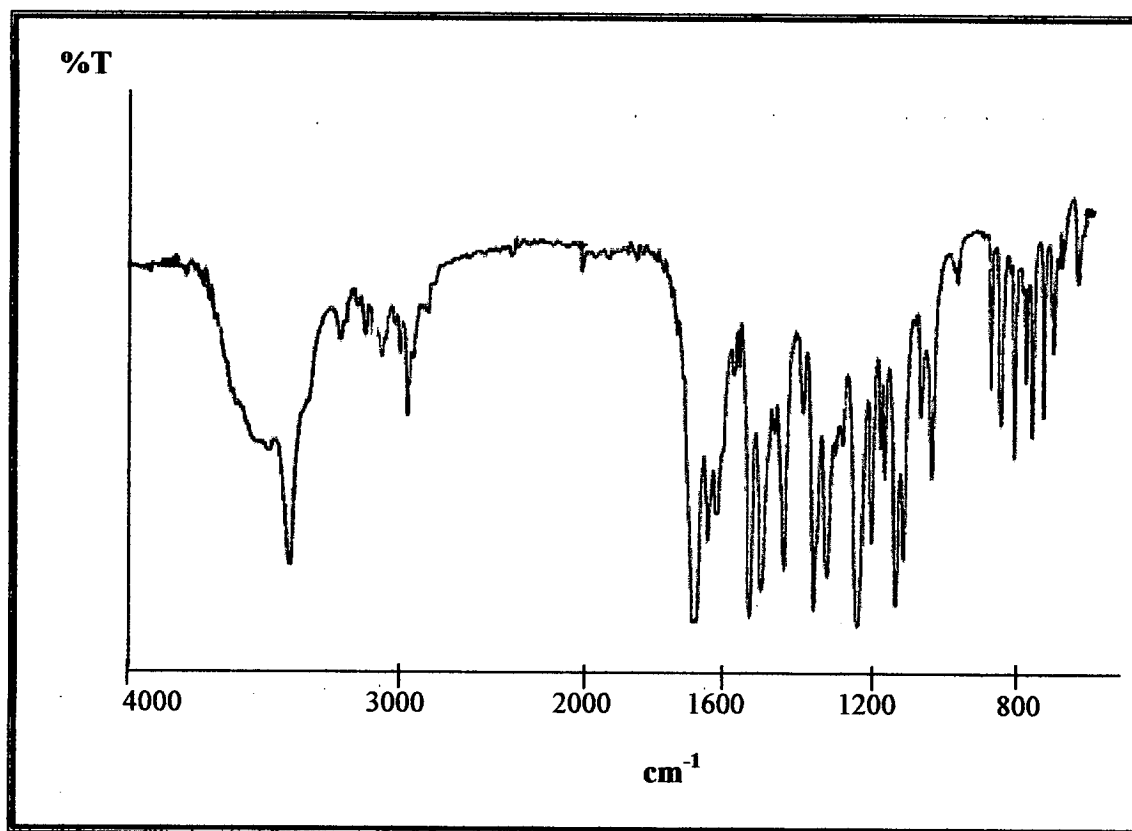


Figura 3. Espectro de absorción infrarrojo de nifedipino.

4.1.4.- Espectrofotometría convencional UV/Visible

Esta técnica se utiliza en los análisis rutinarios del principio activo (método 1) y para cuantificar la cantidad absorbida del nifedipino durante los ensayos de cesión in vitro, realizados con la celda de Franz (método 2), por su rapidez y comodidad.

Se ha empleado un equipo Beckman DU-6, en función del tipo de estudio realizado se llevan a cabo en dos medios distintos:

1.- En metanol:

- Método:

Se prepara una solución de nifedipino en metanol con una concentración de 1 mg/ml. Posteriormente, se toma una alícuota de esta solución y se diluye en metanol hasta obtener una concentración final de 20 µg/ml, sobre la que se realiza un barrido espectrofotométrico entre 600 y 200 nm, a una velocidad de barrido de 300 nm/min, y empleando una cubeta de 1 cm de paso óptico.

- Resultados y comentarios:

El espectro de absorción UV/Vis (Figura 4) muestra dos picos a 350 nm y a 237,5 nm. El máximo de absorción corresponde al pico con una longitud de onda (λ) de

237,5 nm. Esta longitud de onda, por tanto, se ha seleccionado para el desarrollo de este método espectrofotométrico cuantitativo de análisis.

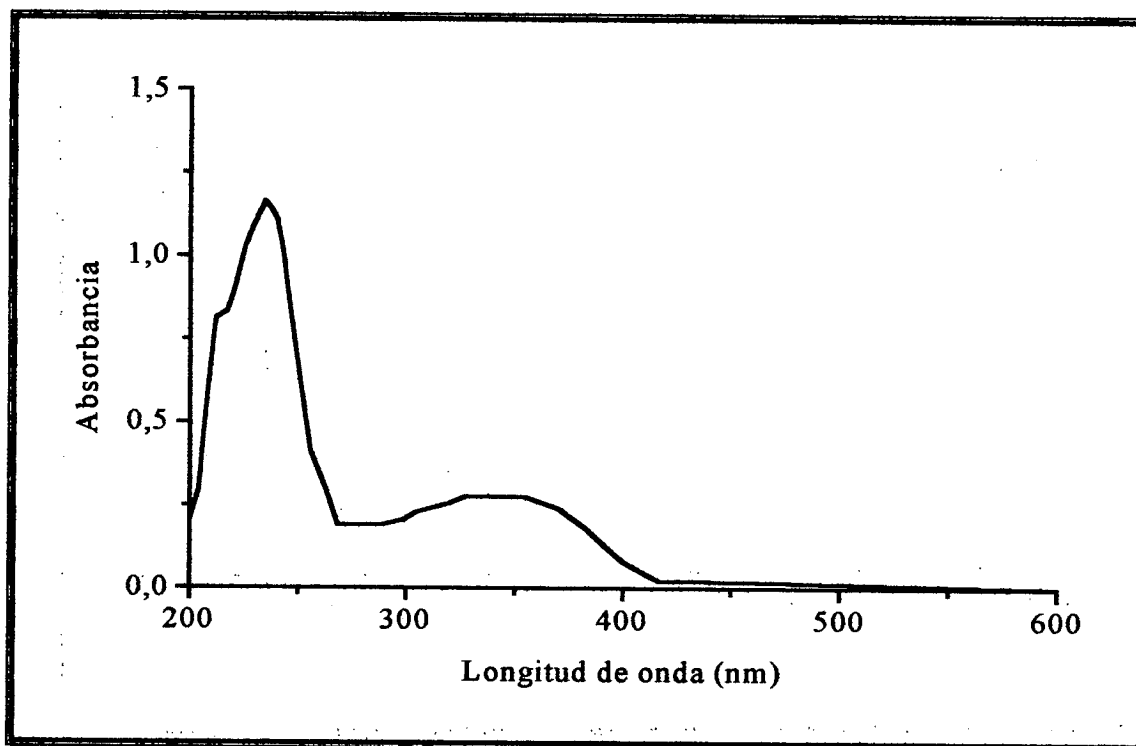


Figura 4. Espectro de absorción UV/Vis del nifedipino en metanol.

Los máximos obtenidos al utilizar metanol como solvente, son análogos a los encontrados en la bibliografía para dicho principio activo (Syed Laik Ali, 1989). Por ello, se puede afirmar que la identificación es positiva.

2.- En tampón fosfato potásico monobásico pH=6,0/Propilenglicol (70/30, v/v).

- Método:

Se prepara una solución de nifedipino en tampón fosfato potásico monobásico pH=6,0/Propilenglicol (70/30, v/v) con una concentración de 1 mg/ml. Posteriormente, se toma una alícuota de dicha solución y se diluye con el mismo solvente hasta obtener una concentración final de 15 µg/ml, sobre la que se realiza un barrido espectrofotométrico entre 600 y 200 nm, a una velocidad de barrido de 300 nm/min, y empleando una cubeta de 1 cm de paso óptico.

- Resultados y comentarios:

El espectro de absorción UV/Vis (Figura 5) muestra dos picos a 336 nm y a 237,5 nm. El máximo de absorción corresponde al pico con una longitud de onda (λ) de 237,5 nm. Esta longitud de onda, por lo tanto, se ha seleccionado para el desarrollo de este método espectrofotométrico cuantitativo de análisis.

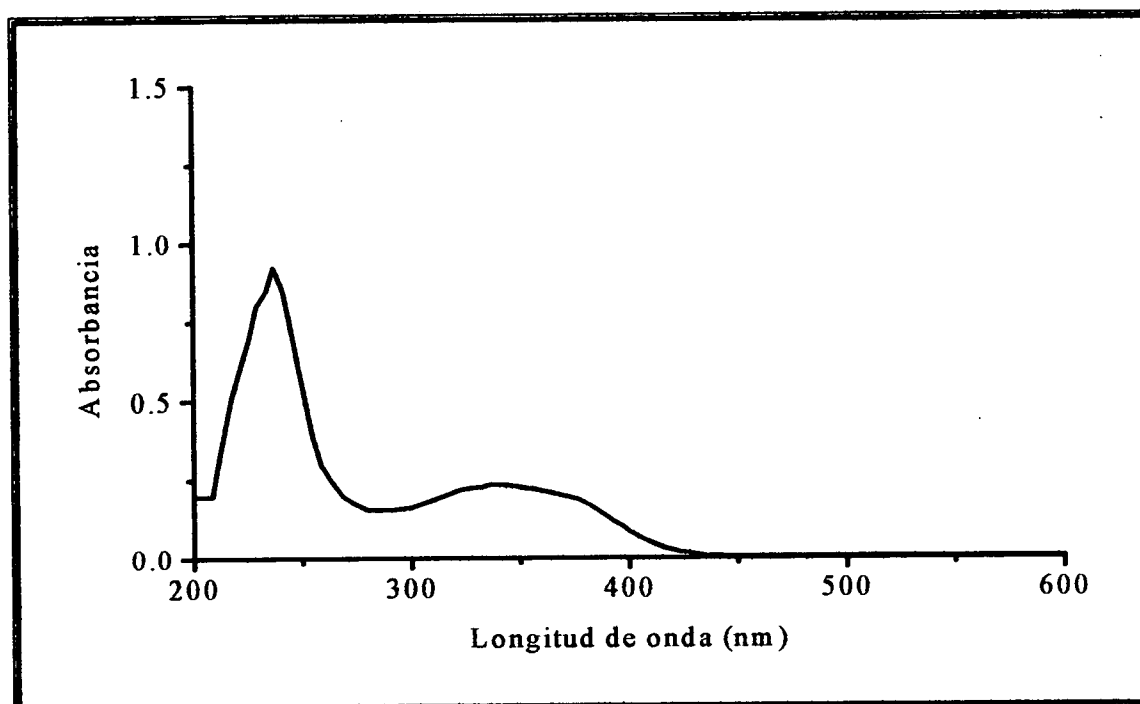


Figura 5. Espectro UV/Vis del nifedipino en tampón fosfato potásico monobásico pH=6,0/Propilenglicol (70/30, v/v).

4.1.5.- Espectrofotometría UV/Visible de primera derivada

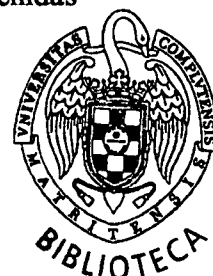
En los estudios de estabilidad del principio activo a la luz se ha desarrollado este método analítico como una alternativa a: 1) la espectrofotometría UV/Visible convencional puesto que, permite la cuantificación de nifedipino, en presencia de los productos procedentes de su fotodegradación sin interferencia de los mismos (apartado 4.4.2.) y 2) la técnica de H.P.L.C. ya que permite cuantificar el principio activo de forma más rápida y sencilla, además de ser una técnica más precisa, como se puede apreciar en los parámetros de validación correspondientes (apartado 4.2.2.).

- Método:

Se prepara una solución de nifedipino en metanol de 20 $\mu\text{g/ml}$, que se protege de la luz debido a su fotosensibilidad. Se realiza un barrido en el espectrofotómetro desde 600 a 200 nm, con un incremento de longitud de onda ($\Delta\lambda$) de 16 nm y una velocidad de barrido de 600nm/min. Se emplea una cubeta de 1 cm de paso óptico.

- Resultados y comentarios:

El espectro de absorción UV/Visible de primera derivada (Figura 6), muestra dos picos de absorción a 243 y 387,5 nm. El pico de absorción correspondiente a una longitud de onda (λ) de 387,5 nm se ha seleccionado para el desarrollo de los métodos cuantitativos de análisis por dos motivos: 1) a esta longitud de onda no existe interferencia de los productos de degradación (apartado 4.4.2.); 2) las medidas obtenidas



frente al rango de concentraciones de principio activo estudiado (5-30 $\mu\text{g/ml}$), dan la mejor respuesta lineal con respecto al otro pico de absorción (243 nm).

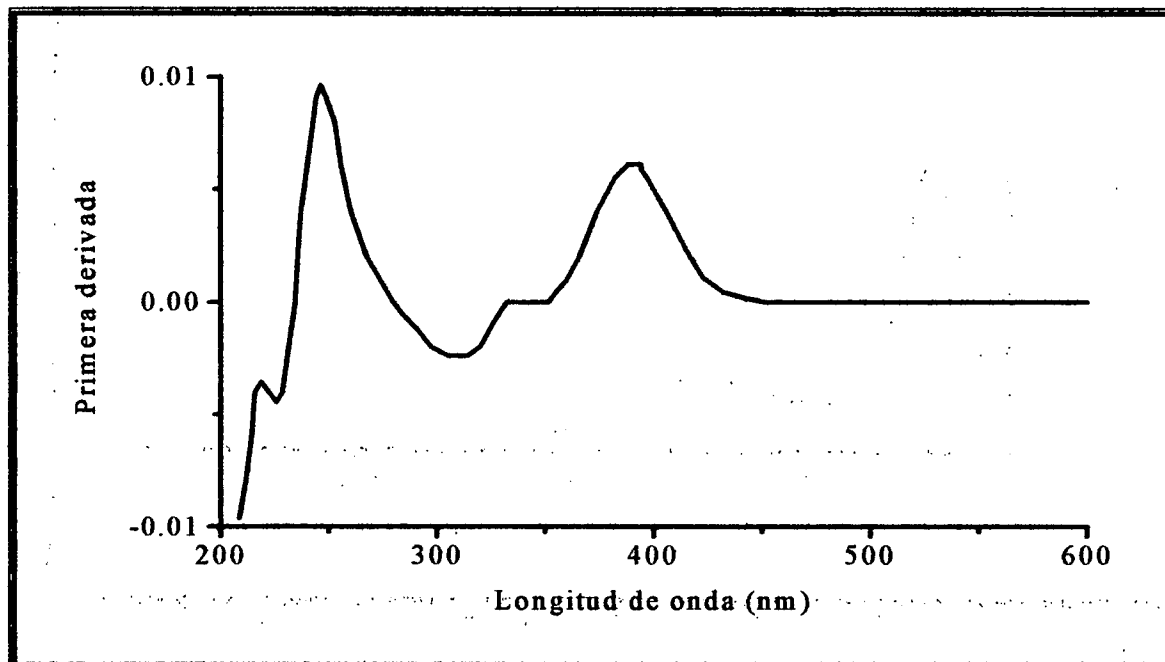


Figura 6. Espectro de absorción UV/Visible de primera derivada del nifedipino en metanol.

Este método ha resultado ser una técnica novedosa y de gran interés, aplicada en un estudio de estabilidad realizado sobre una formulación de nifedipino en forma de microemulsión múltiple o/a/o, que ha sido objeto de publicación por parte de este grupo de investigación (Castro y cols., 2001).

4.1.6.- Cromatografía de líquidos de alta eficacia (H.P.L.C.)

Para la identificación y cuantificación del principio activo en los ensayos de estabilidad realizados sobre la materia prima y los productos terminados se ha puesto a punto un método analítico isocrático. Dicho método está basado en el desarrollado por Grundy y cols. (1994) con algunas modificaciones. Para llevar a cabo el análisis se utiliza un cromatógrafo de líquidos HP serie 1050 con detector UV/Visible series 1050, e integrador HP series 3396, y como fase estacionaria, una columna Extrasil C8 de 15x0,4 cm y 5 μm de tamaño de poro interno.

- Método:

Se prepara una solución de nifedipino, que se protege de la luz debido a su fotosensibilidad, con una concentración de 1mg/ml. Posteriormente, se toma una alícuota de dicha solución y se diluye en metanol hasta obtener una solución del principio activo con una concentración final de 20 $\mu\text{g/ml}$. Esta solución de nifedipino (20 $\mu\text{g/ml}$) se pasa por un filtro de membrana de nylon con un tamaño de poro de 0,45 μm , inyectándose un volumen de 20 μl en el cromatógrafo.

Como fase móvil se utiliza una mezcla metanol/agua (65:35), que se ajusta aproximadamente a pH=4 con ácido acético y trietilamina, a una concentración final de 1% y 0,03%, respectivamente. El flujo se mantiene durante todo el análisis a 1 ml/min. La longitud de onda del detector se fija a 237,5 nm (máximo de absorción del nifedipino observado en el apartado 4.1.4.)

- Resultados y comentarios:

La figura 7 muestra el cromatograma del nifedipino obtenido por el método analítico descrito. Como se puede observar, aparece un pico correspondiente a dicho principio activo con un tiempo de retención aproximado de unos 4,5 minutos.

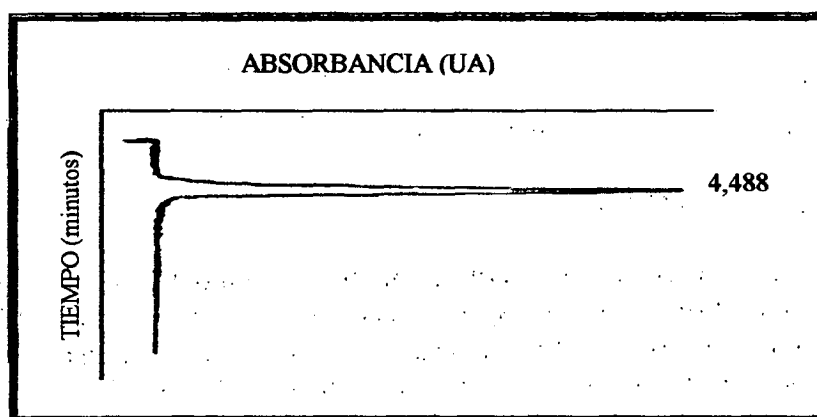


Figura 7. Cromatograma del nifedipino.

En el cromatograma no se observa ningún pico adicional y tampoco se aprecian interferencias con el frente, por lo que el método se considera adecuado para la identificación de nifedipino.

4.1.7.- Cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina se ha utilizado para el análisis cualitativo en los estudios de estabilidad a luz del nifedipino en estado sólido o incorporado en una múltiple microemulsión (Castro y cols. 2001), ya que, como se comentó anteriormente, es una sustancia que sufre procesos de fotodescomposición (Majeed y cols., 1987; Marciniak y cols., 1992).

- Método:

Se prepara una solución de nifedipino en metanol con una concentración de 1 mg/ml, que se protege de la luz. Sobre cromatofolios de aluminio 20 x 20 cm Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) de 0,2 mm de espesor de capa, se depositan 20 µl de la solución. Estas placas se disponen en diferentes fases móviles.

El revelado de las manchas se efectúa situando la placa correspondiente bajo la acción de la luz UV a una longitud de onda de 254 nm.

Las fases móviles que se han utilizado se recogen en la tabla 2:

<i>Fases móviles</i>	<i>Proporción</i>	<i>Constante dieléctrica (ϵ)</i>
benceno-metanol (Marciniec y Richcik, 1994)	85:15	18,22
benceno-metanol	75:25	9,84
etilacetato-ciclohexano (Marciniec y cols., 1992)	50:50	4,01
tolueno-metanol	90:10	5,40
cloroformo-metanol	90:10	6,94
metanol-amoniaco	100:0,5	32,40
metanol-tolueno-amoniaco	50:50:1,5	17,50

Tabla 2 Fases móviles utilizadas en cromatografía en capa fina.

- Resultados y comentarios:

Mediante el empleo de las fases móviles benceno-metanol (85:15) y etilacetato-ciclohexano (50:50) se observa que sólo aparece una mancha intensa correspondiente al nifedipino con un R_f de 0,67 y 0,57, respectivamente. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Marciniec y Richcik (1994) y Marciniec y cols. (1992). Al igual que en los casos anteriores, con las fases móviles benceno-metanol (75:25), cloroformo-metanol (90:10), metanol-amoniaco (100:0,5) y metanol-tolueno-amoniaco (50:50:1,5) únicamente se ha visualizado una mancha intensa correspondiente al nifedipino con un valor de R_f de 0,68, 0,89, 0,78 y 0,80, respectivamente.

Con la fase móvil tolueno-metanol (90:10) también se observa una mancha de gran intensidad que corresponde al nifedipino con un valor de R_f de 0,38. Esta fase móvil se ha seleccionado para realizar los estudios de fotoestabilidad por ser capaz de separar mayor número de productos procedentes de la fotodegradación de este principio activo, que los otros métodos mencionados (ver apartado 4.4.2).

4.2.-Métodos analíticos cuantitativos

Para la determinación del principio activo, en los diferentes estudios realizados, se han puesto a punto varias técnicas analíticas.

4.2.1.- Espectrofotometría convencional UV/Visible

Esta técnica se ha utilizado en el análisis rutinario del principio activo por su rapidez y comodidad. Los estudios se llevan a cabo en dos medios distintos:

a) En metanol

Debido a que el principio activo es soluble en metanol y prácticamente insoluble en agua (Martindale, 1996), la utilización de metanol para la valoración del principio

activo se considera adecuada en aquellos ensayos donde se requiere determinar su contenido total.

b) En tampón fosfato pH=6,0/Propilenglicol (70/30; v/v).

Se ha puesto a punto el método analítico en tampón fosfato pH=6,0/Propilenglicol (70/30; v/v), debido a que constituye el medio receptor que se emplea en los ensayos de cesión in vitro realizados en esta memoria.

4.2.2.- Espectrofotometría UV/Visible de primera derivada

Este método analítico se ha puesto a punto por ser una técnica rápida y sencilla que permite cuantificar el nifedipino en los ensayos de estabilidad a la luz, realizados sobre el principio activo en estado sólido o incorporado en una múltiple microemulsión (Castro y cols., 2001). Al contrario de lo que ocurre con la espectrofotometría UV/Visible de orden cero esta técnica permite cuantificar el principio activo evitando la interferencia de los productos procedentes de su fotodegradación.

4.2.3.- Cromatografía de líquidos de alta eficacia (H.P.L.C.)

La validación de este método analítico se ha puesto a punto para cuantificar el nifedipino en los ensayos de estabilidad realizados sobre materia prima y producto terminado. Es un método analítico isocrático basado en el desarrollado por Grundy y cols. (1994) con algunas modificaciones.

4.2.4.- Validación de los procedimientos analíticos

El objetivo de la validación de un procedimiento analítico es la demostración documentada de que dicho procedimiento es el adecuado para el propósito que deseamos. Un procedimiento analítico se refiere a la forma de realizar el análisis. Debe detallar adecuadamente la forma de preparar las muestras, la utilización del aparato, la curva de calibración, etc.

Los procedimientos analíticos validados más comunes son:

1. Ensayos de identificación.
2. Ensayo cuantitativo de impurezas.
3. Ensayo límite de control de impurezas.
4. Ensayo cuantitativo del principio activo u otros componentes.

Concretamente, en este estudio se han validado distintos métodos analíticos para la cuantificación del principio activo, nifedipino (<http://www.eudra.org/emea.html>).

Los parámetros típicos requeridos en la validación de un método analítico, para la posterior cuantificación del principio activo son:

-A.- Linealidad: es la capacidad para producir resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito de la muestra.

Se calcula por la determinación de la recta de regresión que presenta el mejor ajuste relacionando las respuestas (absorbancias o áreas de los picos en el cromatograma) con la concentración del analito.

-A.1.- Cálculo de la recta de regresión: la cuantificación se realiza mediante rectas de calibrado para cada método analítico, por lo tanto, la linealidad es una propiedad fundamental para las determinaciones cuantitativas. Un coeficiente de correlación próximo a la unidad indica buena linealidad.

-A.2.- Test de linealidad

-A.2.1.- Coefficiente de variación de los factores de respuesta ($f=y/x$): el factor de respuesta es la relación entre la respuesta y la concentración. Para una concentración determinada, el factor de respuesta puede tomarse como una expresión aproximada de la sensibilidad del calibrado a esta concentración. En una calibración lineal los factores de respuesta deben ser semejantes entre sí y próximos al valor de la pendiente. Coeficientes de variación (C.V.) superiores al 5% indican falta de linealidad.

-A.2.2.- Significación estadística de la varianza de la pendiente b : la pendiente b , también llamado coeficiente de regresión, representa la sensibilidad. Una mayor pendiente se asocia a una mayor sensibilidad del método analítico, ya que pequeños cambios en la concentración originan importantes modificaciones en la respuesta obtenida.

-A.2.2.1.- Cálculo de la varianza: la varianza de la pendiente (S^2_b) se utiliza como expresión matemática de la linealidad, de tal forma que una menor varianza indica mejor linealidad.

-A.2.3.- Test de proporcionalidad: el valor de a , intersección con el eje de ordenadas u ordenada en el origen, indica el error sistemático del método. En el caso ideal debe ser igual a cero.

-B.- Precisión: es el grado de concordancia entre los valores de una serie repetida de ensayos analíticos efectuados sobre una muestra homogénea o, expresado de otra forma, la distribución de los valores analíticos alrededor de su media. La precisión indica la capacidad del procedimiento analítico para dar resultados semejantes cuando se aplica repetidamente a una muestra. La idea de precisión, en general, viene expresada por la media para el valor central y la desviación estándar para la dispersión de los resultados.

-B.1.- Repetibilidad: es la medida de la precisión de un procedimiento analítico efectuado en las mismas condiciones, sobre la misma muestra, por un mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos aparatos y reactivos y en el curso de la misma serie de análisis efectuados, generalmente, en un corto intervalo de tiempo.

En nuestro estudio, se ha determinado la repetibilidad calculando el coeficiente de variación de los resultados obtenidos del análisis; mediante los diferentes métodos analíticos propuestos, de seis soluciones preparadas con el 100 % de la concentración estándar (20 µg/ml) (Castro y cols., 1999). El C.V. debe ser $\leq 3\%$.

-B.2.- Reproducibilidad: es la medida de la precisión de los resultados de un procedimiento analítico efectuado sobre la misma muestra pero en condiciones diferentes de analistas, instrumentación, reactivos, laboratorios y días de análisis.

La reproducibilidad se determina calculando el C.V. de los resultados obtenidos del análisis, por triplicado, de las soluciones estándar preparadas al 80, 100 y 120 %, en tres días diferentes (Castro y cols., 1999; Moreno y cols., 2000).

-C.- Exactitud: indica la capacidad de un procedimiento analítico para dar resultados lo más próximos posibles al valor verdadero. Si la diferencia entre el valor hallado y el valor verdadero es pequeña, la exactitud es buena. Es un término que no debe confundirse con la precisión. La precisión está relacionada con la dispersión de una serie de mediciones, pero no da ninguna indicación de lo cerca que se encuentran del valor verdadero. Podemos tener mediciones muy precisas pero poco exactas; sin embargo, para que un método sea exacto, se requiere un cierto grado de precisión.

Se determina aplicando el procedimiento analítico, objeto de validación, a una mezcla de los componentes de la formulación desarrollada que contiene cantidades conocidas de las sustancias que queremos valorar. Se recomienda usar un mínimo de nueve determinaciones sobre un mínimo de tres niveles de concentración que cubran el rango especificado; por ejemplo, 3 concentraciones (80, 100 y 120 %)/tres réplicas de cada uno (Castro y cols., 1999; Moreno y cols., 2000; Franqueza, 2000). Se ha utilizado la concentración de 20 µg/ml como el 100 % de la concentración estándar.

Matemáticamente, se expresa en forma de porcentaje de recuperación de la cantidad de analito presente en la muestra.

Estadísticamente se aplica la "t de Student" para determinar si el valor medio de los porcentajes de recuperación de cada una de las tres concentraciones empleadas y el valor considerado verdadero, para cada uno de los niveles de concentración, no difieren significativamente para un grado de libertad de 0,05.

-D.- Especificidad: para la validación de procedimientos analíticos de determinación de potencia o contenido, es la capacidad de un método analítico para medir de forma exacta y específica el analito, sin interferencia de impurezas, productos de degradación, compuestos relacionados o excipientes que puedan estar presentes en la muestra. Para la verificación de la especificidad de los procedimientos analíticos, se someten las soluciones del blanco al mismo análisis que el de las muestras.

-E.- Límite de cuantificación: es la menor cantidad de analito presente en una muestra, que puede ser cuantificada con adecuada precisión y exactitud por un método analítico.

Se calcula a partir del análisis de al menos cinco muestras de diferentes concentraciones de nifedipino, considerando como límite de cuantificación la menor concentración que presentó un C.V. menor del 20% (Moya y cols., 2000).

-F.- Límite de detección: es la menor cantidad de analito presente en una muestra, que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada por un método analítico.

El límite de detección se calcula experimentalmente como aquella concentración donde se puede encontrar una diferencia significativa entre una solución estándar (20 µg/ml) y soluciones problemas a las que se adicionan concentraciones crecientes de nifedipino con respecto a la concentración estándar (Castro y cols., 1999).

- Métodos:

1.- Espectrofotometría UV/Visible convencional de disoluciones en metanol.

Para validar el método analítico se preparan soluciones patrón de nifedipino en metanol con una concentración de 1 mg/ml. Posteriormente, se hacen diluciones con el mismo solvente, hasta alcanzar un intervalo de concentraciones entre 1 y 25 µg/ml. Dichas soluciones se valoran por espectrofotometría UV/Visible mediante un espectrofotómetro Beckman DU-7 a una longitud de 237,5 nm. De cada concentración se realizan tres determinaciones utilizándose, en todos los casos, metanol como blanco. Todas las muestras se protegen de la luz durante su preparación debido a la fotosensibilidad del nifedipino.

2.- Espectrofotometría UV/Visible convencional de disoluciones en tampón fosfato pH=6,0/propilenglicol (70/30; v/v).

Para validar el método analítico se preparan soluciones patrón de nifedipino en tampón fosfato pH=6,0/propilenglicol (70/30; v/v) con una concentración de 1 mg/ml. Posteriormente, se hacen diluciones con el mismo solvente hasta alcanzar un intervalo de concentraciones comprendido entre 1 y 25 µg/ml. Dichas soluciones se valoran por espectrofotometría UV/Visible mediante un espectrofotómetro Beckman DU-7 a una longitud de 237,5 nm. De cada concentración se realizan tres determinaciones utilizándose, en todos los casos, tampón fosfato pH=6,0/propilenglicol (70/30; v/v) como blanco. Todas las muestras se protegen de la luz durante su preparación debido a la fotosensibilidad del nifedipino.

3.- Espectrofotometría UV/Visible de primera derivada.

Se preparan soluciones patrón de nifedipino en metanol con una concentración de 1 mg/ml. Posteriormente, se hacen diluciones con el mismo solvente hasta alcanzar un intervalo de concentraciones comprendido entre 5 y 30 µg/ml. Dichas soluciones se valoran por espectrofotometría UV/Visible de primera derivada mediante un espectrofotómetro Beckman DU-7 a una longitud de 387 nm y con una amplitud de banda de 16 nm ($\Delta\lambda$). De cada concentración se realizan tres determinaciones

utilizándose, en todos los casos, metanol como blanco. Todas las muestras se protegen de la luz durante su preparación debido a la fotosensibilidad del nifedipino.

4.- Cromatografía líquida de alta resolución (H.P.L.C.).

Para validar el método cromatográfico se preparan soluciones patrón con una concentración de 1 mg/ml. Posteriormente, se hacen diluciones con el mismo solvente hasta alcanzar un intervalo de concentraciones entre 1 y 25 $\mu\text{g/ml}$. Dichas soluciones se valoran mediante el método isocrático, descrito en el análisis cualitativo. De cada concentración se realizan tres determinaciones. Todas las muestras se protegen de la luz durante su preparación debido a la fotosensibilidad del nifedipino.

Se realiza un análisis de regresión por mínimos cuadrados de los datos obtenidos al valorar las soluciones patrón, ajustándolos a un modelo de regresión lineal.

- Resultados y comentarios:

Las figuras 8, 9, 10 y 11 muestran las rectas de calibrado obtenidas con los diferentes métodos.

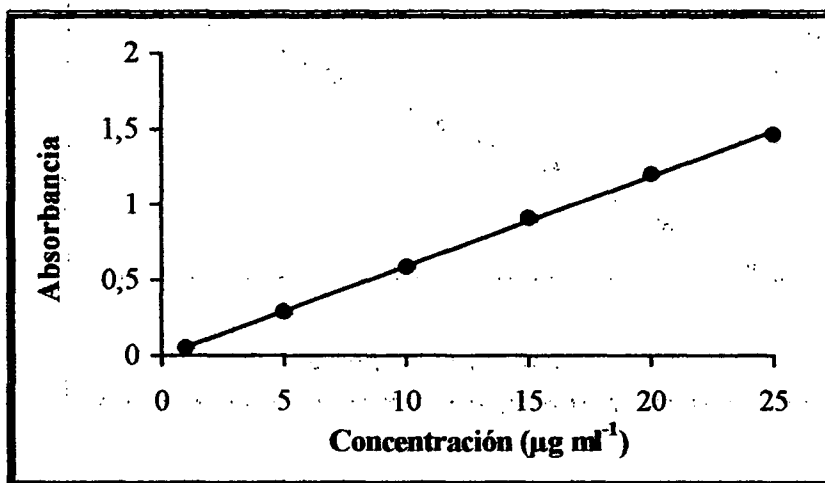


Figura 8. Recta de calibrado del método 1.

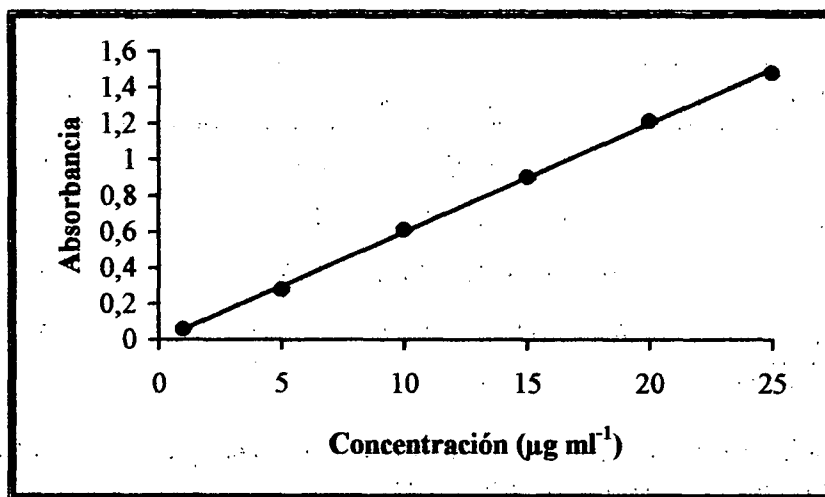


Figura 9. Recta de calibrado del método 2.

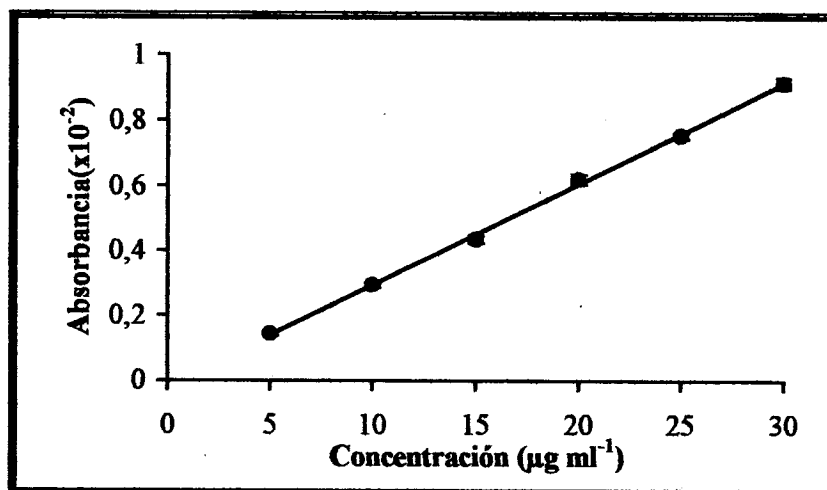


Figura 10. Recta de calibrado del método 3.

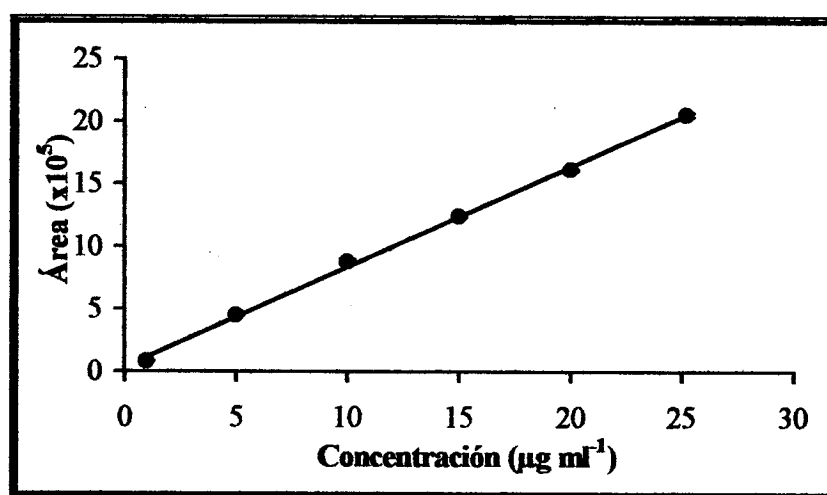


Figura 11. Recta de calibrado del método 4.

Los datos del análisis de regresión por mínimos cuadrados se muestran en la tabla 3.

Método	Ecuación	r^2
1	$Abs=0,0593 \cdot Conc-0,0013$	0,9990
2	$Abs=0,0565 \cdot Conc+0,0195$	0,9960
3	$Abs=30,94 \times 10^{-5} \cdot Conc-15,33 \times 10^{-5}$	0,9988
4	$Abs=80237,43 \cdot Conc+33817,02$	0,9980

Tabla 3. Parámetros de la recta de regresión.

Estos resultados nos indican que la linealidad es buena, ya que el coeficiente de determinación en todos los casos es superior a 0,99.

Los valores obtenidos para los parámetros analizados en los ensayos de linealidad y proporcionalidad, se encuentran recogidos en las tablas 4 y 5.

Parámetro	Método 1	Método 2	Método 3	Método 4	Valor aceptado
<i>Factor de respuesta</i>	0,058	0,0578	$2,97 \cdot 10^{-4}$	84110,87	< 5%
<i>Coefficiente de variación</i>	3,392	4,432	3,015	4,326	
<i>Varianza de b</i>	$1,89 \cdot 10^{-7}$	$2,86 \cdot 10^{-4}$	$5,83 \cdot 10^{-9}$	5168138	
<i>Varianza del error experimental total</i>	$2,01 \cdot 10^{-4}$	$8,84 \cdot 10^{-2}$	$9,25 \cdot 10^{-6}$	$5,24 \cdot 10^9$	
<i>Desviación estándar de b</i>	$4,35 \cdot 10^{-4}$	$1,69 \cdot 10^{-2}$	$7,64 \cdot 10^{-5}$	2273,35	
<i>Desviación estándar relativa de b</i>	0,735	30,041	24,687	2,83	>2,921
<i>Límite superior de confianza</i>	0,065	0,105	$5,32 \cdot 10^{-4}$	86877,90	
<i>Límite inferior de confianza</i>	0,058	0,006	$8,63 \cdot 10^{-5}$	73596,96	
<i>Test estadístico de b ($p=0,01$)</i>	136,1	3,328	4,051	35,29	

Tabla 4. Parámetros estadísticos del análisis de regresión de la pendiente.

Parámetro	Método 1	Método 2	Método 3	Método 4	Valor aceptado
<i>Valor de a</i>	-0,0013	0,0195	$1,53 \cdot 10^{-4}$	33817,02	<1,746
<i>Varianza de a</i>	$1,45 \cdot 10^{-5}$	$2,19 \cdot 10^{-2}$	$7,37 \cdot 10^{-7}$	$3,95 \cdot 10^8$	
<i>Desviación estándar de a</i>	$3,81 \cdot 10^{-3}$	0,147	$8,59 \cdot 10^{-4}$	19876,51	
<i>Desviación estándar relativa de a</i>	-2,93	758,34	-560,15	58,78	
<i>Límite superior de confianza</i>	$5,35 \cdot 10^{-3}$	0,278	$1,35 \cdot 10^{-3}$	68521,40	
<i>Límite inferior de confianza</i>	$-7,95 \cdot 10^{-3}$	-0,238	$-1,65 \cdot 10^{-3}$	-887,36	
<i>Test estadístico de b ($p=0,1$)</i>	0,341	0,132	0,178	1,501	

Tabla 5. Parámetros estadísticos del análisis de regresión de la ordenada en el origen.

Parámetro	Concentración	Método 1	Método 2	Método 3	Método 4	Variable
<i>Repetibilidad</i> (% C.V.)	80 %	1,857	2,216	1,873	3,941	Tiempo
	100 %	0,228	0,311	1,534	1,813	
	120 %	0,212	0,150	1,234	2,731	
<i>Reproducibilidad</i> (% C.V.)	80 %	3,695	2,323	1,632	1,634	
	100 %	1,039	0,929	2,093	2,190	
	120 %	0,762	0,454	1,425	2,844	
<i>Exactitud</i> Test t ($p=0,05$) $t_{tab}=4,303$		0,901	1,242	1,143	0,781	
<i>Especificidad</i>		Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	

Tabla 6. Resultados de repetibilidad, reproducibilidad, exactitud y especificidad de los métodos analíticos validados.

Parámetro	Método 1	Método 2	Método 3	Método 4
<i>Límite de cuantificación</i> ($\mu\text{g/ml}$)	0,50	0,60	0,50	1,00
<i>Límite de detección</i> ($\mu\text{g/ml}$)	0,10	0,10	0,10	0.40

Tabla 7. Límites detección y cuantificación de los métodos validados.

Los cuatro métodos son lineales ya que los valores se encuentran dentro de los límites especificados. Todos los métodos presentan valores experimentales del test de Student mayores a los tabulados (2,921; $p=0,01$; $n-2=16$), lo que indica que la probabilidad de que b sea distinto de cero es elevada, superior al 99%. Además, los cuatro métodos validados cumplen la condición de proporcionalidad ya que los límites de confianza del término independiente, en todos los casos, incluyen al cero y los valores experimentales del test de Student son inferiores a los tabulados (1,746; $p=0.1$; $n-2=16$). Esto indica que hay una probabilidad menor del 90% de que sea distinto de cero. Por lo tanto, en todos los casos la recta se encuentra cerca del origen de coordenadas ya que la probabilidad de que sea distinto cero no es elevada.

Según los parámetros resumidos en la tabla 6, podemos concluir que todos los métodos validados, son reproducibles, repetibles, exactos y específicos para el análisis de nifedipino.

4.3.- Características físicas y físico-químicas del principio activo

4.3.1.- Punto de fusión

La determinación del punto de fusión se realiza mediante dos tipos de técnicas:

- Gradiente de temperatura:

Se utiliza una unidad de determinación del punto de fusión BÜCHI B-540 que permite calcular este parámetro de acuerdo con las metodologías de la farmacopea. Se deposita una cierta cantidad de nifedipino en el interior de unos capilares de vidrio, que se introducen en el horno de la unidad BÜCHI, previamente calentado hasta una temperatura inferior a la del punto de fusión (setpoint). A continuación, a través de un cristal, se observa la muestra y se anota la temperatura a la que funde a medida que la temperatura aumenta según el gradiente que se ha establecido.

Las condiciones de análisis fueron:

Setpoint	→	100°C
Gradiente	→	10°C
Maxpoint	→	180°C

Cuadro 3. Condiciones experimentales del método de gradiente de temperatura.

- Calorimetría diferencial de barrido:

La metodología y las condiciones del ensayo para esta técnica se encuentran recogidas en el apartado 4.1.1.

- Resultados y comentarios:

En la tabla 8 se recogen los resultados de los estudios realizados para determinar el punto de fusión.

<i>Gradiente de temperatura</i>	<i>DSC</i>
172,6°C±0,36	173,6°C±0,45

Tabla 8. Punto de fusión (°C) del nifedipino (materia prima) mediante dos técnicas.

Estos datos coinciden con los obtenidos en la bibliografía (Syed Laik Ali, 1989), que aportan un valor de punto de fusión entre 171 y 175°C.

4.3.2.- Higroscopicidad

Este estudio tiene como finalidad conocer el comportamiento higroscópico del nifedipino cuando se somete a ambientes de diferentes humedades relativas (H.R.).

- Método:

Para obtener las diferentes humedades relativas, necesarias para este estudio, se

preparan soluciones saturadas de diferentes sales (excepto para la obtención de la humedad relativa del 16 % en donde se prepara una solución acuosa de H_2SO_4) que se introducen en desecadores herméticamente cerrados y a temperatura ambiente. En el cuadro 4 se resumen las soluciones empleadas así como las humedades relativas obtenidas.

<i>Soluciones</i>	<i>Humedad relativa (%) a 20°C</i>
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	97
$\text{NaClO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	75
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	50
CaCl_2	35
Solución acuosa H_2SO_4 al 61%	16

Cuadro 4. Soluciones empleadas para la obtención de las diferentes H.R.

En cada desecador se colocan muestras de principio activo en placas petri abiertas. Cada cierto tiempo se toman muestras por triplicado y se valora su contenido en agua, mediante la técnica de Karl-Fischer, hasta que se alcanza la humedad de equilibrio. El equipo utilizado en estas valoraciones es un Metrohm 658 Processor y 665 Dossimat.

Una vez que la muestra sometida al ambiente con mayor valor de humedad relativa (97 %) alcanza la humedad de equilibrio, se introduce progresivamente en las demás condiciones ambientales (75, 50, 35 y 16 %) para evaluar el fenómeno de desorción de agua del principio activo.

Las determinaciones de las nuevas humedades de equilibrio también se realizan por triplicado, mediante el procedimiento explicado anteriormente, no pasando las muestras de un desecador a otro hasta que dichas humedades son alcanzadas.

- Resultados y comentarios:

En la determinación del contenido en humedad del nifedipino, al inicio del ensayo, se obtiene un valor de $0,11\% \pm 0,02$. Como se puede ver en la tabla 9, en ninguno de los ambientes de H.R., durante los procesos de absorción y desorción de humedad estudiados, se encuentran valores significativamente diferentes al inicial. Conviene destacar que, incluso a la humedad relativa más alta (97 %), la humedad de equilibrio captada por la muestra es de $0,45 \pm 0,03$. Se concluye que no hay captación de agua por parte de este principio activo.

Por lo tanto, el nifedipino es un sólido insoluble ya que presenta un comportamiento inerte frente a la humedad.

Humedad Relativa (%)	Humedad de equilibrio en proceso de absorción (%) (n=3)	Humedad de equilibrio en proceso de desorción (%) (n=3)
16	0,39± 0,01	0,38± 0,01
35	0,42± 0,01	0,41± 0,01
50	0,43± 0,03	0,42± 0,02
75	0,44± 0,02	0,43± 0,02
97	0,45± 0,03	0,45± 0,03

Tabla 9. Humedades de equilibrio del nifedipino en procesos de adsorción y desorción.

La figura 12 presenta las curvas de humedad de equilibrio del nifedipino en los procesos de absorción y desorción de humedad.

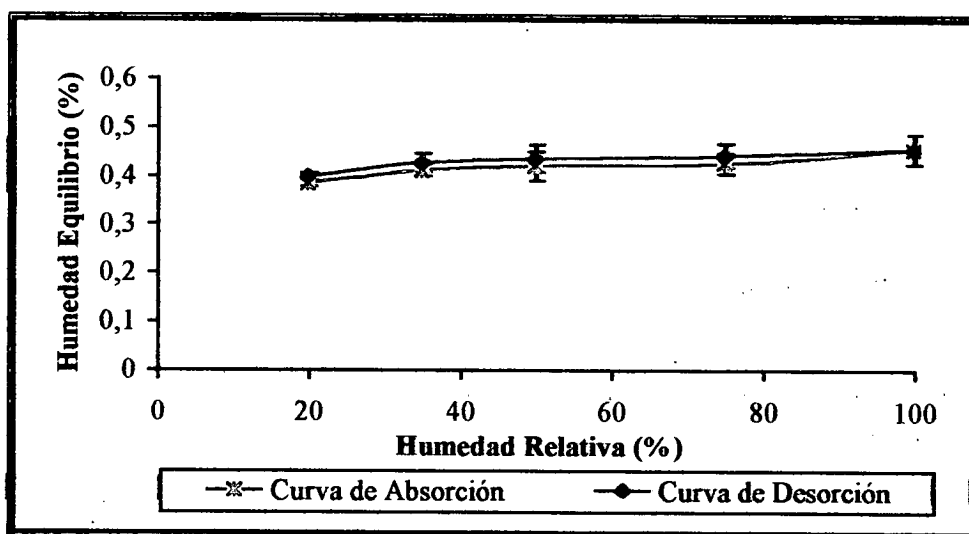


Figura 12. Curvas de absorción y desorción de humedad del nifedipino.

Como se puede observar en la figura 12, el principio activo presenta valores de humedad de equilibrio ligeramente superiores en el proceso de desorción que los hallados en el proceso de absorción, dando lugar a un leve fenómeno de histéresis. Esto nos indica que el nifedipino pierde la poca humedad que capta con menos facilidad que la que adquiere durante el proceso de absorción aunque, en función de los resultados obtenidos, las diferencias no son significativas.

4.3.3.- Coeficiente de reparto (P) octanol/agua del nifedipino

Este estudio tiene como finalidad conocer el comportamiento hidrófilo, lipófilo o anfifílico del principio activo al ponerlo en contacto con una mezcla de dos medios líquidos inmiscibles, acuoso (tampón fosfato USP 23 pH=7,0) y orgánico (octanol),

mediante la determinación de las cantidades de principio activo disuelto en cada fase.

Este dato experimental es de gran relevancia en la presente memoria, fundamentalmente para formular el nifedipino en sistemas dispersos constituidos por una fase acuosa y otra oleosa y decidir en cual de ellas va incorporado.

- Método:

Para la determinación del coeficiente de reparto del principio activo se sigue el método propuesto por Schmaluß y cols. (1997). Para ello se parte de una mezcla de volúmenes iguales de octanol y tampón fosfato USP 23 pH=7,0 que se somete a agitación en vórtex hasta alcanzar el equilibrio (saturación de ambas fases). Posteriormente, se añade a la mezcla una cantidad conocida de principio activo (25 mg) y se somete todo el sistema a agitación en vórtex durante 5 minutos a 2000 r.p.m. Finalmente, se centrifuga la mezcla a 8000 g durante 5 minutos, transcurridos los cuales se determina la cantidad de nifedipino presente en cada una de las fases por espectrofotometría UV/Vis a una $\lambda=237$ nm, utilizando como blanco metanol. Las determinaciones se llevan a cabo por triplicado.

El coeficiente de reparto se calcula utilizando la ecuación de Nernst:

$$K = a_{org} / a_{aq}$$

donde a_{org} y a_{aq} son las concentraciones de nifedipino en la fase orgánica y en la fase acuosa, respectivamente.

- Resultados y comentarios:

La tabla 10 muestra las concentraciones de nifedipino en cada una de las fases, así como las cantidades totales de fármaco presente en las mismas y el coeficiente de reparto (K) octanol/agua.

	<i>Octanol</i>	<i>Tampón fosfato pH=7,4</i>
<i>Concentraciones de nifedipino ($\mu\text{g/ml}$)</i>	$(6,21 \pm 0,9) \cdot 10^3$	$19,65 \pm 0,11$
<i>Cantidades totales disueltas (mg/ml)</i>	$155,25 \pm 1,23$	$0,49 \pm 1,25 \cdot 10^{-3}$
<i>Coeficiente de reparto (K_{oct})</i>	$315,72 \pm 1,76$	

Tabla 10. Concentraciones totales y cantidades disueltas de nifedipino en octanol y agua. K_{oct} de nifedipino.

En función de los resultados obtenidos se puede confirmar que el principio activo es una molécula con marcado carácter lipófilo ya que su coeficiente de reparto octanol/agua presenta un valor muy elevado, hecho que indica su tendencia a disolverse en medios de acusado carácter lipófilo. Este valor de K_{oct} es muy similar a los

encontrados para otras moléculas consideradas de carácter marcadamente lipófilo (Lien y Gao, 1995).

4.3.4.- Determinación del pH de máxima estabilidad del nifedipino en solución acuosa

Este estudio tiene como finalidad conocer la estabilidad del principio activo frente a las variaciones de pH y determinar el pH o el intervalo de pH en el que el principio activo presenta mayor estabilidad. El conocimiento de este parámetro es de gran importancia ya que algunas de las formulaciones desarrolladas presentan un elevado porcentaje de agua.

- Método:

Para la determinación del pH de máxima estabilidad se preparan soluciones del principio activo en medios acuosos con diferentes valores de pH y posteriormente se evalúa el contenido de nifedipino de dichas soluciones por HPLC a distintos tiempos. La duración total del ensayo es de 72 horas, el número de muestras analizadas para cada valor de pH, a cada tiempo, es de 3 ($n=3$) y la temperatura durante todo el estudio se mantiene a 25°C.

El cuadro 5 muestra las soluciones empleadas en el estudio y los valores de pH de cada una de ellas, a los que se somete el principio activo.

Soluciones	Valores de pH
Tampón glicocola/HCl (Sörensen) —————→	1 y 3
Tampón fosfato USP 23 —————→	5 y 7
Tampón glicocola/NaOH (Sörensen) —————→	9,11 y 13

Cuadro5. Soluciones empleadas para la determinación del pH de máxima estabilidad del nifedipino.

- Resultados y comentarios:

La tabla 11 muestra los datos de estabilidad obtenidos a cada tiempo en el estudio realizado a distintos valores de pH. Como se puede observar, la estabilidad del nifedipino en solución acuosa es ligeramente inferior a pH ácidos y notablemente inferior a pH alcalinos extremos ($\text{pH}=13$). El intervalo de pH de máxima estabilidad del principio activo, durante todo el tiempo del estudio (72 horas), es el comprendido entre 7,0 y 11,0 aproximadamente, con un valor medio en contenido de nifedipino del $94,3\pm 3,4$ al final de dicho estudio, y siendo el valor de pH de máxima estabilidad el correspondiente a 9,0 con un contenido de principio activo del 97,1%. Como hemos comentado anteriormente, el valor pH donde la estabilidad es significativamente menor, es el correspondiente a 13 con un contenido de principio de 59,2%.

Si consideramos los resultados obtenidos hasta las 24 y 48 horas, el intervalo de máxima estabilidad se amplía hasta 5,0, con valores medios en el contenido en

nifedipino de $97,4 \pm 2,2$ y $94,4 \pm 3,7$, respectivamente. Sin embargo, al máximo valor de pH (pH=13,0), el principio activo se mantiene estable en solución durante las primeras ocho horas de nuestro estudio, obteniéndose contenidos de nifedipino correspondientes al 77,8% transcurridas 24 horas de ensayo.

Tiempo (horas)	Valores de pH de las soluciones						
	1,1	3,3	5,2	6,9	8,9	11,0	13,0
0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
1	100,1	100,0	100,3	99,9	100,0	100,1	100,2
	$\pm 0,92$	$\pm 0,42$	$\pm 0,29$	$\pm 0,31$	$\pm 0,90$	$\pm 0,55$	$\pm 0,86$
8	99,96	100,0	99,9	100,2	100,2	99,9	99,9
	$\pm 0,75$	$\pm 0,37$	$\pm 0,75$	$\pm 0,29$	$\pm 0,17$	$\pm 0,21$	$\pm 0,32$
24	88,9	89,5	94,4	98,4	99,3	96,7	77,8
	$\pm 0,10$	$\pm 0,12$	$\pm 0,56$	$\pm 0,45$	$\pm 0,56$	$\pm 0,47$	$\pm 0,28$
30	85,2	86,1	91,8	97,7	98,4	95,3	68,84
	$\pm 0,48$	$\pm 0,56$	$\pm 0,62$	$\pm 0,52$	$\pm 0,51$	$\pm 0,20$	$\pm 0,58$
48	85,0	86,0	90,2	96,8	98,1	92,3	62,9
	$\pm 0,19$	$\pm 0,12$	$\pm 0,21$	$\pm 0,51$	$\pm 0,13$	$\pm 0,58$	$\pm 0,62$
72	84,9	85,3	86,9	95,3	97,1	90,6	59,2
	$\pm 0,58$	$\pm 0,47$	$\pm 0,19$	$\pm 0,38$	$\pm 0,28$	$\pm 0,19$	$\pm 0,22$

Tabla 11. Porcentaje de nifedipino de las muestras valoradas en la determinación del pH de máxima estabilidad.

4.3.5.- Solubilidad del nifedipino en soluciones acuosas de distintos pH

Este estudio tiene como finalidad determinar la influencia del pH en la solubilidad del nifedipino, mediante la determinación del coeficiente de solubilidad a cada pH.

- Método:

La solubilidad del nifedipino se determina en las soluciones acuosas de distintos pH, preparadas a partir de los tampones que están recogidos en el cuadro 5. Para ello, se adiciona un exceso de principio activo a 10 ml de solución acuosa con distintos pH, en viales de vidrio cerrados y protegidos de la luz. Estas soluciones se someten a agitación con vórtex a 2000 r.p.m durante 15 minutos y después se introducen en un baño de agitación Techne SB-16 con una velocidad constante de 20 r.p.m. y a una temperatura de $25 \pm 0,4^\circ\text{C}$. El tiempo requerido por las muestras para alcanzar el punto de saturación se evalúa mediante el análisis por HPLC, del contenido en nifedipino de alícuotas tomadas de las muestras ($n=3$) cada 2 horas.

La duración del ensayo no supera las 8 horas con el fin de evitar de la degradación de las muestras, como queda reflejado en el apartado 4.3.4.

El equilibrio se alcanza cuando el contenido de una misma muestra, determinado en dos intervalos de tiempo consecutivos, no varía en más de un 3%, siendo dicho valor el coeficiente de solubilidad del principio activo en las soluciones acuosas con distintos pH (Rajagopalan y cols., 1988). Las soluciones empleadas para la realización de este ensayo son las mismas que las utilizadas en el apartado 4.3.4.

- Resultados y comentarios:

La tabla 12 muestra los coeficientes de solubilidad del nifedipino a 25°C en solución acuosa a distintos pH. Como se puede observar, la solubilidad del nifedipino en solución acuosa es muy pequeña aunque se encuentra ligeramente influenciada por el pH de la solución.

A pH ácidos, el nifedipino aumenta su solubilidad a medida que aumenta el valor de pH de 1 a 3. Sin embargo, a pH=5 el principio activo presenta el menor valor de solubilidad en solución acuosa (0,8 µg/ml).

<i>Valores de pH de las soluciones</i>							
	<i>1,0</i>	<i>3,1</i>	<i>5,0</i>	<i>7,0</i>	<i>9,1</i>	<i>11,0</i>	<i>12,9</i>
Solubilidad	5,6	14,4	0,8	12,9	29,2	31,4	18,5
(µg/ml)	$\pm 2,2 \cdot 10^{-2}$	$\pm 4,1 \cdot 10^{-2}$	$\pm 6,1 \cdot 10^{-3}$	$\pm 8,1 \cdot 10^{-2}$	$\pm 9,7 \cdot 10^{-2}$	$\pm 1,2 \cdot 10^{-1}$	$\pm 7,6 \cdot 10^{-2}$

Tabla 12. Solubilidad del nifedipino en soluciones acuosas de distintos pH.

A valores de pH alcalinos, se aumenta ligeramente la solubilidad a medida que aumenta el pH. Este incremento se observa en el intervalo de pH comprendido entre 7 y 10, siendo a pH=10 donde se obtuvo el mayor valor de solubilidad para el principio activo (31,4 µg/ml). A pH=13 la solubilidad de nifedipino disminuye hasta una concentración de 18,5 µg/ml.

Si se comparan los intervalos de pH ácidos (1,0-3,1) y básicos (9,1-11,0) en los que se observa una mayor solubilidad del principio activo, se puede concluir que aunque la solubilidad del mismo en solución acuosa es muy pequeña, son los pH básicos los que ejercen un mayor efecto en la solubilidad del nifedipino.

4.3.6.- Estudios y determinación de coeficientes de solubilidad del nifedipino en solventes y sistemas de solventes

Estos estudios tienen como finalidad evaluar la solubilidad del nifedipino en distintos solventes y sistemas de solventes, mediante la determinación de los coeficientes de solubilidad del principio activo. Asimismo, se estudia la influencia de la adición de determinados tensioactivos (polisorbato 80 y polioxietilen 10-oleileter) como

exaltadores de la solubilidad del nifedipino, tanto en medio acuoso (tampón fosfato USP 23 pH=7,4) como oleoso (miristato de isopropilo).

- Método:

La solubilidad del nifedipino se determina en los solventes y sistemas de solventes que aparecen reflejados en la tabla 13. Para ello, se adiciona un exceso de principio activo a 10 ml del disolvente en viales de vidrio cerrados y protegidos de la luz. Estos viales se introducen en un baño de agitación Techne SB-16 con una velocidad constante de 20 r.p.m. y a una temperatura de $25 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$.

El tiempo requerido por las muestras para alcanzar el punto de saturación varía de unas muestras a otras y se evalúa mediante el análisis por HPLC del contenido en nifedipino de alícuotas tomadas de las muestras ($n=3$) cada 24 horas. El equilibrio se alcanza cuando el contenido de una misma muestra, determinado en dos intervalos de tiempo consecutivos, no varió en más de un 3%, siendo dicho valor el coeficiente de solubilidad del principio activo en los distintos solventes y sistemas de solventes.

Por otra parte, las concentraciones normalizadas en solución acuosa del polisorbato 80 (Tween[®] 80) y polioxietilen 10-oleileter (Bri[®] 96) se obtienen dividiendo las diferentes concentraciones de los tensioactivos empleados por la concentración crítica micelar (CMC) de cada uno de los tensioactivos, de tal forma que, la concentración normalizada del es por definición la CMC (Maurin y cols.,1996). La CMC del polisorbato 80 (Tween[®] 80) y polioxietilen 10-oleileter (Bri[®] 96) obtenidas a partir de los datos del proveedor (Fluka Chemika), resultan ser de 0,0013% y 0,0075%, respectivamente. Una vez preparadas las soluciones acuosas con las concentraciones normalizadas de cada uno de los tensioactivos, se toman 10 ml cada solución que se llevan a viales de vidrio y se adiciona un exceso de principio activo.

Posteriormente, las muestras son tratadas según los comentado anteriormente para la determinación del coeficiente de solubilidad en los sistemas de solventes preparados.

- Resultados y comentarios:

Como puede observarse en la tabla 13, el nifedipino presenta un comportamiento lipófilo, presentando mayor tendencia por los disolventes oleosos (miristato de isopropilo, octanol) que por las soluciones acuosas (soluciones tampón) confirmandose de este modo los resultados y conclusiones obtenidas en los apartados 4.3.3 y 4.3.5.

La presencia de cosolventes como el polietilenglicol 400 y el propilenglicol incrementan significativamente la solubilidad del nifedipino, tanto en medio acuoso (tampón fosfato) como oleoso (miristato de isopropilo). Este aumento de la solubilidad se produce de manera más significativa en medio oleoso que acuoso con ambos cosolventes; siendo el polietilenglicol 400 el que presenta mayor capacidad solubilizadora en ambos medios. Por lo tanto, debido a su gran capacidad solubilizadora, la utilización de ambos cosolventes en la formulación del principio activo podría resultar interesante.

Los tensioactivos en medio acuoso presentan la capacidad de formar micelas. En las micelas de los tensioactivos no iónicos, la polaridad aumenta desde el centro hacia la capa de polioxietileno, proporcionando diferentes zonas para solubilizar el principio activo (Arnason y Elworthy, 1980).

<i>Sistemas de solventes</i>	<i>Proporción (v/v)</i>	<i>Solubilidad (mg/ml)</i>
N,N Dimetilacetamida	—	175,60±0,17
IPM/DMA	(4:1)	24,30±0,14
Miristato de isopropilo (IPM)	—	1,91±3,1·10 ⁻²
Polietilenglicol 400 (PEG 400)	—	62,21±0,23
Propilenglicol (PG)	—	8,07±0,13
IPM:Brij® 96	(1:1)	25,65±0,18
IPM:Brij® 96	(2:1)	22,46±0,17
IPM:Brij® 96	(3:1)	20,04±0,12
IPM:Brij® 96	(4:1)	14,48±0,19
IPM:PG	(1:1)	8,48±0,12
IPM:PG	(2:1)	8,07±0,10
IPM:PG	(3:1)	6,03±3,9·10 ⁻²
IPM:PG	(4:1)	5,46±3,9·10 ⁻²
IPM:PEG 400	(1:1)	47,30±0,23
IPM:PEG 400	(2:1)	46,22±0,32
IPM:PEG 400	(3:1)	39,94±0,11
IPM:PEG 400	(4:1)	35,88±0,27
Tampón fosfato:PEG 400	(1:1)	1,52±9,4·10 ⁻³
Tampón fosfato: PEG 400	(2:1)	0,35±1,8·10 ⁻²
Tampón fosfato: PEG 400	(3:1)	0,19±5,4·10 ⁻³
Tampón fosfato: PEG 400	(4:1)	0,16±1,2·10 ⁻²
Tampón fosfato:PG	(1:1)	0,98±1,3·10 ⁻²
Tampón fosfato:PG	(2:1)	0,23±9,5·10 ⁻³
Tampón fosfato:PG	(3:1)	0,11±7,5·10 ⁻³
Tampón fosfato:PG	(4:1)	(5,9±0,7) ·10 ⁻²
Brij® 96:PEG 400	(1:1)	47,03±0,11
Brij® 96:PEG 400	(2:1)	29,36±0,08
Brij® 96:PEG 400	(3:1)	18,04±0,02
Brij® 96:PEG 400	(4:1)	14,78±0,10
Brij® 96:PG	(1:1)	22,63±0,11
Brij® 96:PG	(2:1)	21,95±0,05
Brij® 96:PG	(3:1)	17,61±0,06
Brij® 96:PG	(4:1)	17,18±0,09
Tween® 80:PEG 400	(1:1)	58,99±0,44
Tween® 80:PEG 400	(2:1)	41,74±0,43
Tween® 80:PEG 400	(3:1)	24,24±0,31
Tween® 80:PEG 400	(4:1)	23,62±0,22

Tabla 13. Coeficientes de solubilidad del nifedipino en distintos solventes.

Las micelas presentan la capacidad de retirar las moléculas lipófilas, como es el caso del nifedipino, del medio acuoso reduciendo la energía libre del sistema. En las micelas, las moléculas poco polares se incorporan en la parte central del tensioactivo donde se localizan las cadenas de hidrocarburos.

La solubilización de moléculas, utilizando sistemas acuosos de tensioactivos sobre la concentración crítica micelar (CMC), ofrece la posibilidad de poder formular fármacos poco solubles en agua. Para explicar este fenómeno se preparan soluciones acuosas con concentraciones iguales y superiores a la CMC.

La figura 13 muestra el incremento en la solubilidad del nifedipino en solución acuosa a medida que aumenta la concentración normalizada de los tensioactivos no iónicos empleados (concentración de los tensioactivos no iónicos dividida por su CMC).

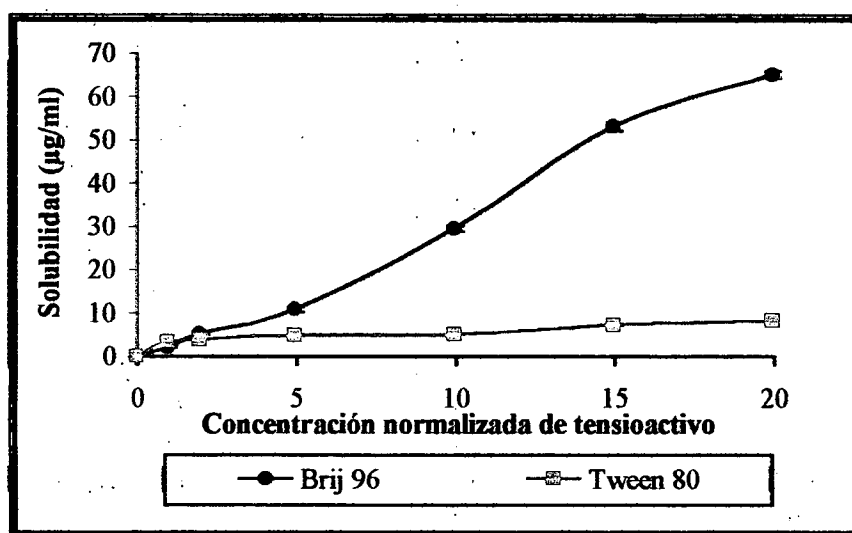


Figura 13. Solubilidad del nifedipino en función de la concentración normalizada de Brij® 96 y Tween® 80.

De los dos tensioactivos, el Brij® 96 presenta mayor capacidad de solubilización del nifedipino, alcanzando un valor máximo de $68,05 \pm 0,84$ µg/ml. La capacidad solubilizadora del Tween® 80 es menor que la del Brij® 96, alcanzando un valor máximo de $8,11 \pm 0,84$ µg/ml.

Como se ha comentado anteriormente, este aumento de la solubilidad se debe a que los tensioactivos son capaces de formar micelas a concentraciones por encima de su CMC. En solventes no polares como el miristato de isopropilo, los tensioactivos forman micelas invertidas donde la parte con carácter hidrófilo de las moléculas de tensioactivo se localiza en el centro de la micela con las cadenas hidrocarbonadas orientadas hacia el solvente no polar. Las interacciones dipolo-dipolo o, en algunas ocasiones, los puentes de hidrogeno mantienen unidos los grupos hidrófilos de las moléculas de los tensioactivos en el centro de la micela. Esto explica el incremento en la solubilidad del nifedipino en miristato de isopropilo a medida que se aumenta la concentración de Brij® 96 y Tween® 80. Este efecto es mucho mayor para el Brij® 96, donde en una proporción 1:1 con el miristato de isopropilo se consigue solubilizar la cantidad máxima de

nifedipino en este componente oleoso ($25,65 \pm 0,18$ mg/ml). Debido al carácter lipófilo del nifedipino la capacidad solubilizadora de ambos tensioactivos es mucho mayor en medio oleoso (miristato de isopropilo) que en medio acuoso.

Es interesante destacar los altos valores de solubilidad que presenta el nifedipino en sistemas constituidos por tensioactivos no-iónicos y cosolventes. Los sistemas formados por Brij[®] 96 y PEG permiten solubilizar mayor cantidad de nifedipino que los constituidos por Brij[®] 96:PG y Tween[®] 80:PEG 400. En todos los sistemas evaluados el incremento de la solubilidad del principio activo es mayor a medida que aumenta la proporción del cosolvente. Finalmente, de todos los solventes y sistemas de solventes empleados, la N,N dimetilacetamida (DMA) permite solubilizar mayor cantidad de nifedipino. El sistema constituido por IPM/DMA(4:1) permite incrementar trece veces la solubilidad del nifedipino en el medio oleoso (miristato de isopropilo).

4.4.- Estudios de estabilidad del nifedipino

Estos estudios de estabilidad tienen como finalidad la determinación de las condiciones óptimas de conservación del principio activo materia prima en base a su estabilidad frente a las distintas condiciones de luz y temperatura.

La baja higroscopicidad del fármaco, observada a partir de la evaluación de su comportamiento higroscópico, y su baja histéresis, evaluada por medio de ciclos de absorción-desorción de humedad (apartado 4.3.2.), indican escasa influencia de la humedad en la estabilidad del nifedipino, decidiéndose por ello no evaluar la estabilidad del principio activo en distintas condiciones de humedad relativa.

4.4.1.- Estabilidad a la temperatura

Los datos obtenidos en los estudios de DSC (apartado 4.1.1) indican una elevada estabilidad térmica del nifedipino, al no aparecer ningún fenómeno de alteración hasta los 200°C, que se selecciona como temperatura máxima en los estudios de DSC. Sin embargo, dichos estudios no aportaron resultados concluyentes respecto a la estabilidad del principio activo frente a exposiciones prolongadas a temperaturas inferiores, motivo por el cual se decide llevar a cabo estudios de estabilidad del fármaco en distintas condiciones de temperatura.

- Método:

Se disponen muestras de nifedipino, en estado sólido, en viales cerrados y protegidos de la luz, que se someten durante seis meses a las siguientes temperaturas:

- Temperatura $\approx 4^{\circ}\text{C}$ (nevera).
- Temperatura 25°C .
- Temperatura 40°C .
- Temperatura 50°C .

Se toman muestras al inicio y a los 1, 2, 3 y 6 meses, sobre las que se evalúan los siguientes parámetros:

1.- Estabilidad química:

Se preparan soluciones en metanol de las muestras tomadas a los distintos tiempos con una concentración de 10 µg/ml, que se filtran por 0,45 µm y valoran respecto a su contenido en nifedipino, por triplicado (n=3), mediante HPLC. El contenido en principio activo de las muestras debe estar comprendido entre 90-110% para que se consideren estables.

2.- Estabilidad física:

Se evalúan los cambios de color de las muestras, tomadas a los distintos tiempos, comparándolas con la muestra estudiada al comienzo del ensayo. Las muestras del principio activo se consideran estables si presentan el color amarillo característico del nifedipino.

- Resultados y comentarios:

1.- Estabilidad química:

La tabla 14 recoge los resultados obtenidos en el análisis cuantitativo del nifedipino de las muestras sometidas al estudio de estabilidad.

<i>Tiempo (meses)</i>	<i>Condiciones de estabilidad</i>			
	<i>T^a=4°C</i>	<i>T^a=25°C</i>	<i>T^a=40°C</i>	<i>T^a=50°C</i>
0	99,56±1,70	100,14±0,70	99,47±0,75	101,29±1,92
1	100,78±0,21	98,97±0,31	100,12±0,12	99,44±0,69
2	99,74±0,18	98,59±0,10	101,70±0,17	99,81±0,29
3	102,12±0,10	99,64±0,24	99,52±0,58	102,71±0,37
6	97,61±0,27	98,28±0,49	99,32±0,41	99,60±0,56

Tabla 14. Porcentaje de nifedipino de las muestras sometidas al estudio de estabilidad en función de la temperatura.

Como puede observarse, no existe ningún tipo de degradación química cuando el nifedipino se protege de la luz y se somete a temperaturas comprendidas entre 4°C y 50°C durante los seis meses que dura el ensayo. Cuando se realiza un análisis estadístico multifactorial, comparando los resultados obtenidos para los distintos tiempos y temperaturas, se observa que no existen diferencias significativas en los resultados a las diferentes temperaturas.

2.- Estabilidad física:

Las observaciones efectuadas sobre el color de las muestras, tomadas a

diferentes tiempos en el intervalo de temperaturas comprendido entre 4 y 50°C, indican que no se produce degradación física en dichas muestras ya que presentan al final del estudio el color amarillo característico del nifedipino (materia prima) no degradado.

Estos resultados están en concordancia con los obtenidos en el estudio de estabilidad química de las muestras, y ponen de manifiesto la estabilidad térmica del principio activo cuando se almacena en el rango de temperaturas estudiado (4-50°C), durante un periodo de seis meses.

4.4.2.- Estabilidad a la luz

La sensibilidad a la luz de las 1,4-dihidropiridinas es bastante conocida, siendo el nisoldipino y nifedipino los más inestables. El nifedipino sufre fenómenos de oxidación fotoquímica cuando se expone a la luz. Dependiendo de la fuente de irradiación, el nifedipino puede dar lugar, principalmente, a dos productos de degradación (Figura 14).

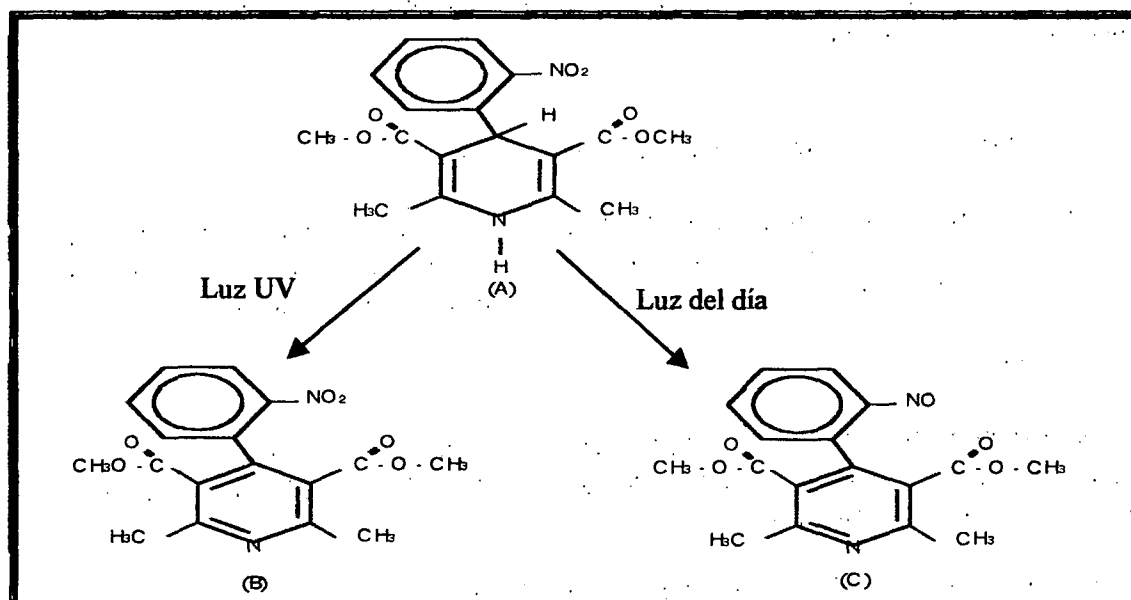


Figura 14. Derivados originados por la foto-oxidación del nifedipino por exposición a la luz del día y luz ultravioleta. A. nifedipino, B. derivado de nitrofenilpiridina, C. derivado de nitrosofenilpiridina.

El principal producto de degradación del nifedipino (materia prima) es el derivado nitrosofenilpiridina que se forma principalmente por la irradiación de la luz del día, pero también, se ha observado que es el principal producto de degradación del nifedipino por acción de la luz ultravioleta (Marciniec y cols., 1992; Marciniec y Rychcik, 1994).

El otro producto procedente de la descomposición del nifedipino es el derivado de nitrofenilpiridina que se considera como una impureza de origen sintético del nifedipino. Este compuesto puede formarse en algunas ocasiones por acción de la luz UV, dependiendo del tiempo de exposición del principio activo a esta fuente de irradiación (Marciniec y Rychcik, 1994).

En los estudios realizados para determinar el efecto que ejercen los distintos

tipos de luz en la estabilidad del nifedipino en soluciones de solventes orgánicos (metanol, etanol y tolueno), no se ha detectado como producto de degradación el nitro derivado. Este comportamiento también se ha observado en la fotodegradación de comprimidos de nifedipino. En ambos casos, el proceso de degradación no se limita a la reacción de dehidrogenación en las 1,4 dihidropiridinas, sino que además se produce una reacción de reducción del grupo nitro y una pérdida de agua que da lugar a la formación del nitroso derivado como el principal producto de degradación.

En nuestro estudio, se evalúa la estabilidad a la luz del principio activo sólido bajo la irradiación de luz UV a longitudes de onda de 355 y 254 nm durante 14 días. Se sigue el protocolo descrito por Moeller (1993) según las directrices de la Comunidad Europea. La estabilidad del nifedipino (materia prima) a la luz del día se evalúa durante 24 horas. También, se estudia el efecto que ejerce la luz del día sobre soluciones acuosas del principio activo a distintos pH. Este estudio se lleva cabo ya que los ensayos de cesión in vitro a través de membrana artificial y biológica que se realizan en esta memoria son en medio acuoso (pH=7,4) y la luz del día constituye el factor más determinante en la degradación del principio activo. Además, en la bibliografía no se han encontrado estudios de este tipo.

4.4.2.1.- Estabilidad del nifedipino (materia prima) a la luz

En este estudio de estabilidad se emplea como técnica analítica cuantitativa la espectrofotometría UV/Visible de primera derivada y dos métodos analíticos cualitativos, como la cromatografía en capa fina y la espectroscopía de absorción infrarroja.

- Método:

Se disponen muestras de nifedipino en placas petri que se someten durante catorce días a radiación UV, a dos longitudes de onda ($\lambda=355$ y $\lambda=254$ nm), y durante 24 horas a la acción de la luz del día.

Se toman muestras al inicio y a los 1, 2, 3 y 14 días para las muestras sometidas a la radiación UV y a la 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 24 horas para las muestras sometidas a la acción de la luz. En todos los casos se evalúan los siguientes parámetros:

1.- Estabilidad química:

Se preparan soluciones metanólicas de muestras, tomadas a los distintos tiempos, con una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$ que se filtran por 0,45 μm y valoran respecto a su contenido en nifedipino, por triplicado ($n=3$), mediante espectrofotometría UV/Visible de primera derivada ($^1D_{387}$). Para que las muestras se consideren estables, el contenido de principio activo debe estar comprendido entre 90-100%.

2.- Estabilidad física:

Se evalúan los cambios de color de las muestras, tomadas a los distintos tiempos, comparándolas con la muestra estudiada al comienzo del ensayo. Las muestras de

principio activo se consideran estables siempre que presenten un color amarillo característico.

Las técnicas empleadas en este estudio son las siguientes:

A.- Cromatografía en capa fina.

- Método:

El método es el descrito en el análisis del principio activo y se utilizan los eluyentes ya mencionados en el apartado 4.1.7.

Para la elección del método cromatográfico en capa fina, empleado con el fin de separar e identificar los productos de degradación, se procede a la total degradación del nifedipino mediante la utilización de radiación UV a $\lambda=254$ nm y bajo la acción de la luz del día. Se selecciona la longitud de onda de 254 nm debido por su mayor efecto degradativo sobre el nifedipino (materia prima) (Marciniec y Rychcik, 1994). En las dos condiciones de estudio, las muestras se analizan cada 7 días, por triplicado, hasta comprobar que el nifedipino se degrada completamente. Una vez que el nifedipino (materia prima) se encuentra totalmente degradado por la acción de la radiación UV ($\lambda=254$ nm), se continua la irradiación UV ($\lambda=254$ nm) del principio activo durante 6 meses.

Se selecciona aquel método que permite separar de manera clara el mayor número de productos de degradación.

- Resultados y comentarios:

El nifedipino adquiere un color amarillo parduzco con la exposición a la luz del día y a la luz UV, lo que nos indica que se produce una alteración del mismo.

De todos los métodos propuestos en el apartado 4.1.7. y que se emplean para la separación e identificación de los productos de degradación del principio activo, únicamente el método cuya fase móvil está constituida por tolueno-metanol (9:1) es capaz de cumplir dicho propósito. La figura 15 muestra la cromatografía realizada en la fase móvil tolueno-metanol (9:1) ($\epsilon=5,40$). El punto A corresponde al nifedipino sin degradar y presenta una gran mancha morada a un valor de R_f de 0,38.

Los puntos B y C corresponden al nifedipino totalmente degradado (inyectado inmediatamente una vez alcanzado el 100% de degradación) por la irradiación UV ($\lambda=254$ nm) y la luz del día, respectivamente. En ambos casos aparecen manchas similares en lo referente al color (morado), intensidad y valores de R_f (0,75) y se originan colas intensas. En ambas condiciones de degradación aparecen manchas de color blanco que indican como se va desplazando el producto de degradación originado a lo largo de la placa hasta alcanzar su valor de R_f definitivo.

El punto D corresponde al nifedipino sometido a la acción de la UV ($\lambda=254$ nm) durante 6 meses, previa total degradación por la radiación de la misma fuente. Como se

puede observar, aparecen tres manchas de color morado, de similar intensidad, diferente tamaño y con valores de R_f de 0,75, 0,61 y 0,46.

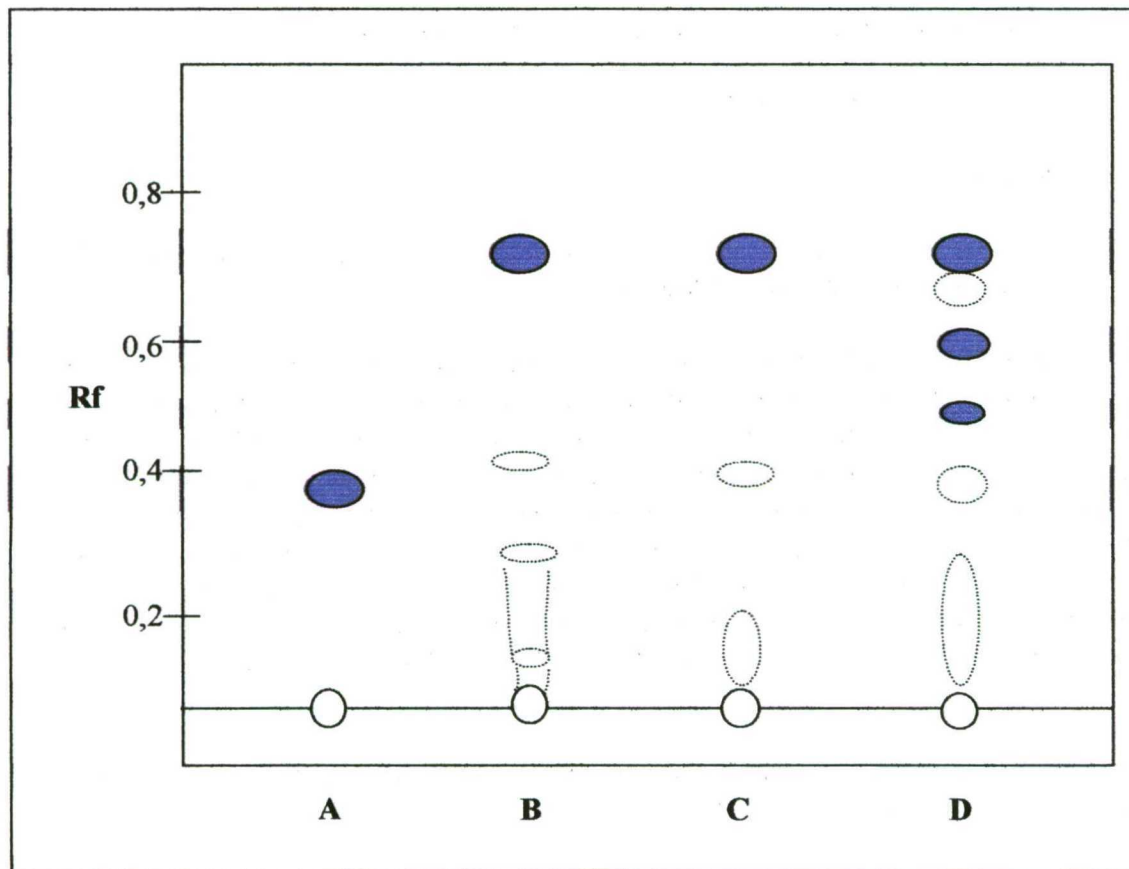


Figura 15. Cromatografía en capa fina del nifedipino (materia prima) utilizando como fase móvil (tolueno-metanol 9:1). A: Nifedipino patrón; B: derivado de nitrofenilpiridina obtenido por acción de la luz UV a una $\lambda=254$ nm una vez degradado completamente; C: derivado de nitrofenilpiridina obtenido por acción de la luz del día una vez degradado completamente; D: productos de degradación obtenidos al someter la muestra de nifedipino, degradada totalmente por la acción de la radiación UV a una $\lambda=254$ nm, durante 6 meses.

De los resultados obtenidos y de acuerdo con la bibliografía consultada, se puede deducir que las manchas con valor de R_f de 0,75 corresponden al derivado nitrofenilpiridina, que aparece como principal compuesto de degradación del nifedipino tanto por la irradiación de la luz UV como por la acción de la luz del día. Además, este método permite separar otros dos productos de degradación con valores de R_f de 0,61 y 0,46, correspondiendo, probablemente, el primero de ellos al derivado de nitrofenilpiridina que se forma únicamente por irradiación de la luz UV cuando se expone a esta fuente durante periodos prolongados de tiempo. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por otros autores en estudios de estabilidad del nifedipino (Marciniec y cols, 1992; Marciniec y Rychcik, 1994).

Por otro lado, las cromatografías realizadas con fase móvil acetato-ciclohexano (6:1), benceno-metanol (3:1), benceno-metanol (6:1) y acetato-ciclohexano (6:1) permiten separar una única mancha con distinto valor de R_f al del nifedipino patrón al depositar soluciones problemas anteriormente preparadas. Mientras que, las cromatografías

realizadas con fase móvil metanol-amoniaco (10:0,5), metanol-tolueno-amoniaco (50:50:1,5) y cloroformo-metanol (9.1) no logran separar ninguna mancha correspondiente a los productos de degradación al inyectar las soluciones problemas B, C y D.

B.- Espectroscopia de absorción infrarroja

- Método:

El método es el descrito en el apartado 4.1.3 para el análisis cualitativo del principio activo. Con esta técnica se pretende identificar los productos de degradación que se originan después de la total descomposición del nifedipino, además, de permitir detectar los efectos degradativos que se originan sobre el principio activo por acción de la luz del día. Las muestras de nifedipino totalmente degradado por acción de la radiación UV y la luz del día se obtienen siguiendo el mismo procedimiento empleado en el apartado A (*cromatografía en capa fina*).

- Resultados y comentarios:

Como se puede observar en la figura 16, los espectros infrarrojo del nifedipino totalmente degradado por acción de la radiación UV y la luz del día muestran diferencias substanciales con respecto al nifedipino materia prima.

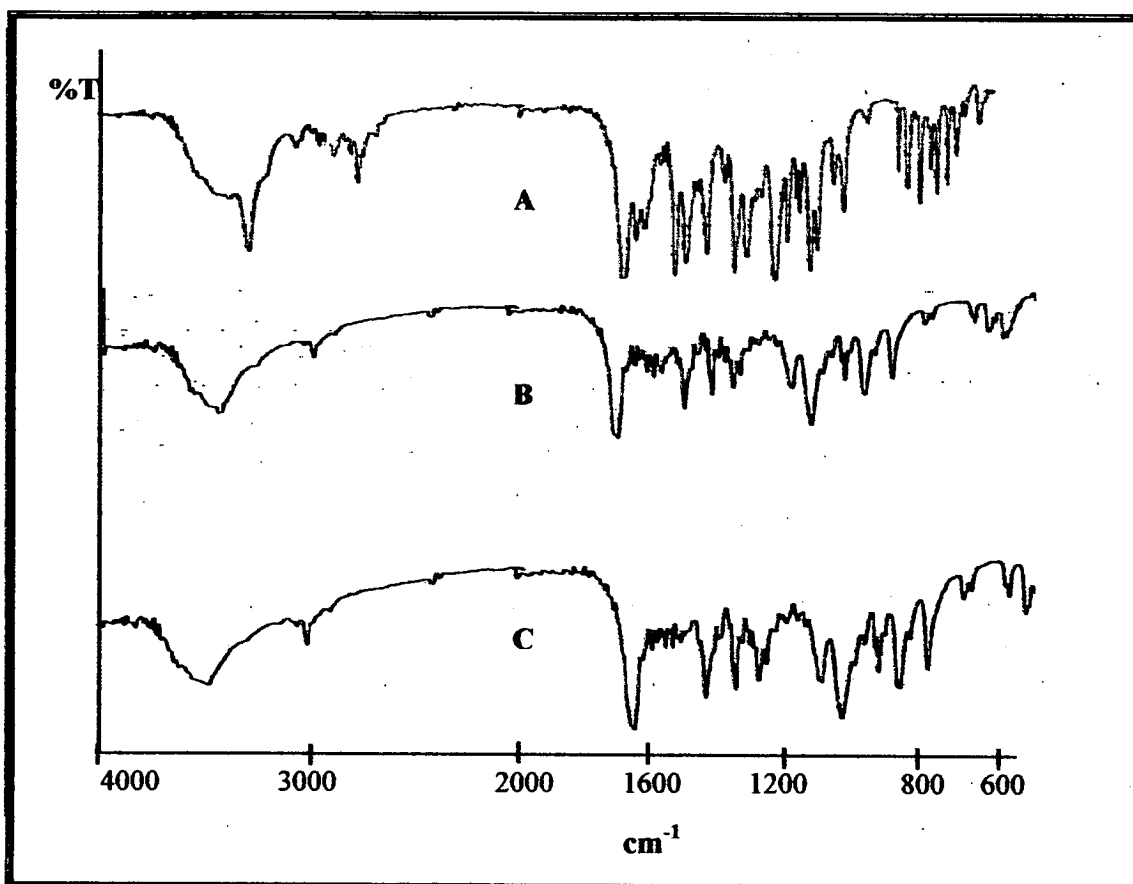


Figura 16. Espectros de absorción infrarrojo de A) nifedipino materia prima; B) nifedipino totalmente degradado por acción de la luz del día; C) nifedipino totalmente degradado por acción de la luz UV.

Dentro del intervalo de frecuencias comprendido entre 3400 cm^{-1} y 1100 cm^{-1} , donde se realiza la asignación de los grupos funcionales que constituyen el nifedipino, se observan importantes modificaciones en ambos espectros (nifedipino degradado por luz del día y por radiaciones UV). Estas modificaciones incluyen la desaparición de bandas características del nifedipino a 3340 cm^{-1} , 3110 cm^{-1} , 1660 cm^{-1} , 1530 cm^{-1} , 1440 cm^{-1} , 1360 cm^{-1} , 1200 cm^{-1} , 1110 cm^{-1} y la aparición de nuevas bandas a 1730 cm^{-1} , 1560 cm^{-1} correspondientes al nuevo producto procedente de la fotodescomposición.

Las modificaciones que se originan, debido al proceso de degradación del nifedipino, a 3340 cm^{-1} , 3110 cm^{-1} y 1530 cm^{-1} indican que se produce una reacción de dehidrogenación del anillo de dihidropiridina en posiciones 1 y 4 y la reducción del grupo nitro, respectivamente, dando lugar a la formación del nitroso derivado como principal producto de degradación.

Durante esta reacción se produce una pérdida de agua que no se encuentra reflejada en los espectros de absorción infrarrojo a pesar de la lipofilia del principio activo. Esto puede ser debido a que la cantidad de agua formada es muy baja para que se pueda detectar o al fenómeno de evaporación que se produce durante la medida de las muestras.

Los espectros de absorción infrarrojo obtenidos por la total fotodegradación del nifedipino, por acción de las dos fuentes de luz empleadas en este estudio, corresponden en ambos casos al derivado de nitrosofenilpiridina. Esta conclusión ha sido confirmada al comparar dichos espectros con el espectro patrón del derivado de nitrosofenilpiridina empleado en los estudios de estabilidad realizados por Marciniak y Rychcik (1994).

C.- Espectrofotometría UV/Visible de primera derivada

- Método:

Esta técnica constituye un método novedoso, desarrollado por nuestro grupo de investigación (Castro y cols. 2001), que permite la cuantificación de nuestro principio activo de manera rápida y sencilla en presencia de los productos de degradación originados por acción de las radiaciones UV y la luz del día. El método analítico, el equipo y las condiciones empleadas son las mismas que se han descrito para el análisis del principio activo (apartado 4.1.5.).

Como se ha demostrado anteriormente mediante las técnicas de cromatografía en capa fina y espectroscopia de absorción infrarroja, el principal producto de degradación para todas las fuentes de irradiación ensayadas es el nitrofenil derivado.

Para determinar la interferencia del producto de degradación en el análisis cuantitativo del nifedipino por espectrofotometría convencional UV/Visible y comprobar la capacidad del método de espectrofotometría UV/Visible de primera derivada (1°D_{387}) de cuantificar nuestro principio activo en presencia del producto de descomposición, se preparan muestras totalmente y parcialmente degradadas de nifedipino. Para ello, se coloca el principio activo en placas petri, bajo la acción de la radiación UV (254 nm). Se selecciona la longitud de onda de 254 nm como fuente de

irradiación, ya que se emplea en otros estudios de estabilidad del nifedipino debido a su mayor efecto degradativo (Marciniec y Rychcik, 1994).

Las muestras se analizan diariamente, por triplicado, mediante el método de HPLC hasta obtener porcentajes de descomposición del 20 y 35% y posteriormente cada 7 días, por triplicado, hasta comprobar que el nifedipino se ha degradado completamente (100% degradado). Una vez conseguidos los porcentajes de degradación deseados se almacenan las muestras en viales herméticamente cerrados y protegidos de la luz en nevera hasta su análisis.

En cada caso, para el análisis de dichas muestras se pesan 25 mg de nifedipino con el porcentaje de degradación correspondiente y se transfieren a un matraz de 25 ml. Se disuelven con metanol y se enrasan a volumen con el mismo solvente, alcanzando una concentración de 1 mg/ml. Posteriormente, se toma 1 ml de dicha solución, se lleva a un matraz de 50 ml y se enrasa a volumen con metanol para alcanzar una concentración teórica correspondiente a 20 µg/ml de nifedipino sin degradar.

- Resultados y comentarios:

Como puede observarse en los espectros convencionales UV/Visible (Figura 17) existe interferencia del principio activo y el producto de degradación originado por la acción de la radiación de la luz UV y la luz del día.

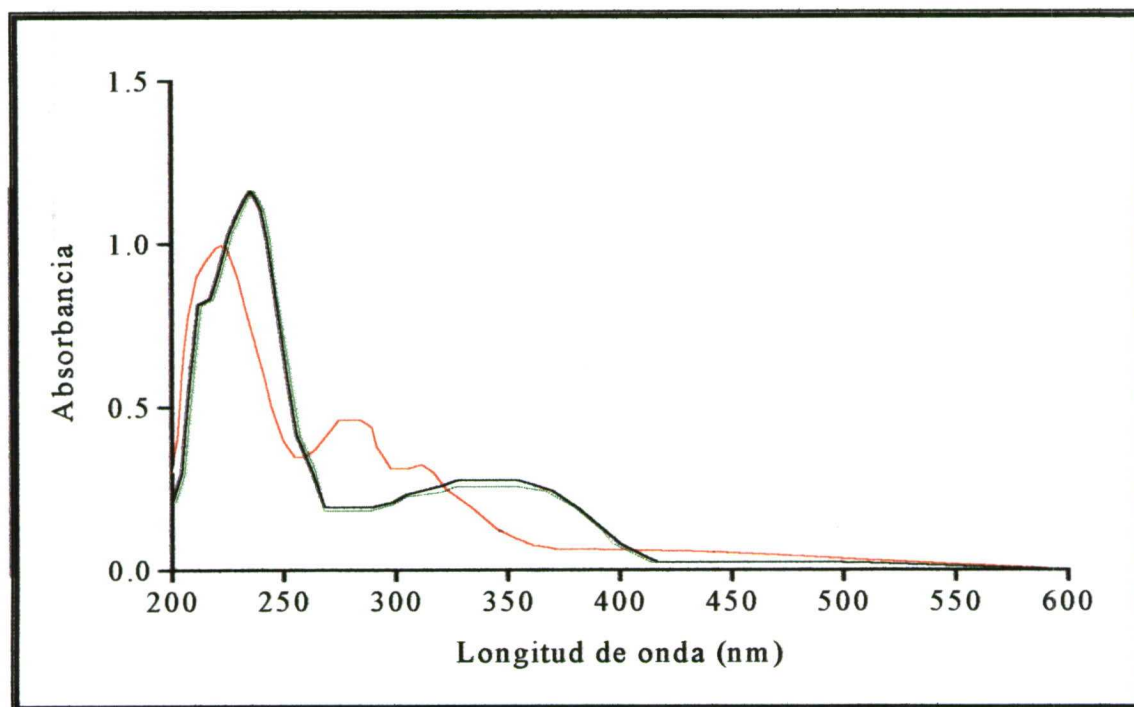


Figura 17. Espectro convencional UV/visible: (—) Solución metanólica de nifedipino sin degradar (20 µg/ml); (—) solución metanólica de nifedipino degradado en un 20%; (—) solución metanólica del producto de degradación (derivado de nitrosofenilpiridina).

Este producto de degradación, como se ha confirmado por TLC y espectroscopía de absorción infrarroja, es el derivado de nitrosofenilpiridina. Esta interacción se produce en la región comprendida entre 200-440 nm lo que imposibilita el análisis de

nifedipino a cualquier longitud de onda. Esto puede comprobarse por el hecho de que el espectro de nifedipino parcialmente degradado (20%) es muy similar al del nifedipino sin degradar debido a que los productos de degradación absorben en el intervalo de longitud de onda mencionado anteriormente.

Por el contrario, la espectrofotometría UV/Visible de primera derivada ($^1D_{387}$) (Figura 18) sí que nos permite cuantificar el nifedipino (materia prima), a una longitud de onda de 387 nm, en presencia de su principal producto de degradación. En esta figura, se puede ver que no existe interferencia del derivado de nitrosofenilpiridina a la longitud de onda a la que se realiza el análisis, ya que sólo se produce interferencia en el intervalo de longitud de onda comprendido entre 200 y 340 nm. Con este método, al contrario de lo que ocurre con la espectrofotometría convencional UV/Visible, se puede cuantificar el nifedipino parcialmente degradado (20%) a 387 nm, debido se produce una disminución significativa de la absorbancia a esta longitud de onda en comparación con el espectro de nifedipino sin degradar (20 µg/ml).

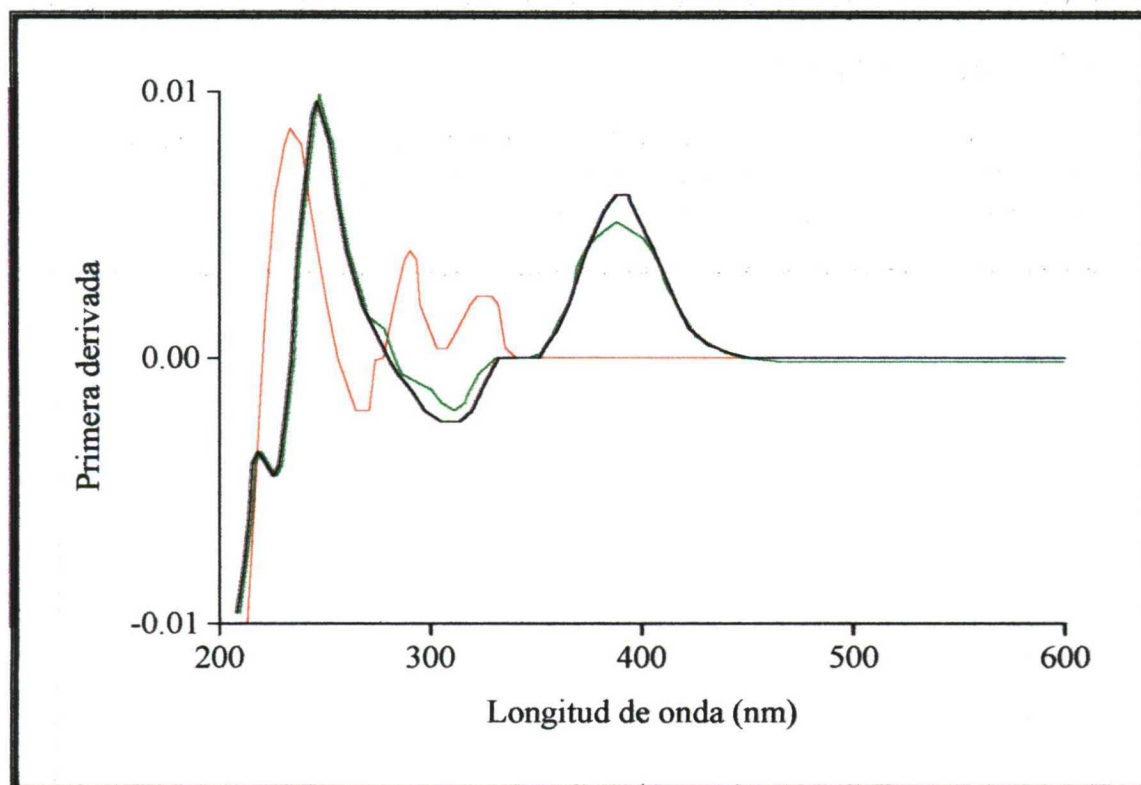


Figura 18. Espectro de primera derivada: (—) Solución metanólica de nifedipino sin degradar (20 µg/ml); (—) solución metanólica de nifedipino degradado en un 20%; (—) solución metanólica del producto de degradación (derivado de nitrosofenilpiridina).

Para ensayar la recuperación de nifedipino (materia prima) mediante la técnica de espectrofotometría de primera derivada en presencia de sus productos de degradación, se analizan muestras con un 20 y un 30% de degradación y los resultados obtenidos se comparan con los de la técnica de HPLC (apartado 4.1.6.).

Los resultados determinados por ambos métodos se encuentran recogidos en la siguiente tabla 15.

Nifedipino degradado (%)	Nifedipino recuperado (Media±Desviación Estándar)	
	¹D₃₈₇	HPLC
<i>0</i>	99,85±0,62	99,92±0,40
<i>20</i>	80,06±0,51	79,96±0,43
<i>35</i>	65,12±0,22	65,07±0,24

Tabla 15. Cuantificación de nifedipino con distintos porcentajes de degradación por ¹D₃₈₇ y HPLC.

Como se puede apreciar existen diferencias significativas en los resultados obtenidos por ambas técnicas. Los valores de recuperación de nifedipino parcialmente degradado determinados por ¹D₃₈₇ y HPLC, están en concordancia con los valores de nifedipino sin degradar cuantificados por estas técnicas.

- Resultados y comentarios:

1.- Estabilidad química:

La tabla 16 recoge los resultados obtenidos en el análisis cuantitativo de nifedipino presente en las muestras sometidas a radiaciones UV a las dos longitudes de onda seleccionadas durante el estudio de estabilidad.

Tiempo (días)	Condiciones de estabilidad	
	Luz UV λ=254 nm	Luz UV λ=355 nm
<i>0</i>	101,63±1,32	101,63±1,32
<i>1</i>	101,05±0,98	102,67±2,10
<i>2</i>	97,31±1,75	101,06±1,81
<i>3</i>	95,22±0,76	100,93±1,11
<i>14</i>	38,23±0,31	79,63±1,84

Tabla 16. Porcentaje de nifedipino presente en las muestras sometidas al estudio de estabilidad a la radiación UV a distintas longitudes onda.

Los resultados obtenidos indican que no se produce degradación química durante el primer día y los tres primeros días del estudio de estabilidad, cuando el nifedipino se somete a las radiaciones UV a la λ=254 nm y λ=355 nm, respectivamente.

Así, se puede concluir, que en estas condiciones de estudio, el nifedipino es mucho más sensible al efecto degradativo producido por la radiación UV a la λ=254 nm. A partir del segundo día, el nifedipino sometido a la radiación UV a la λ=254 nm, a pesar de encontrarse dentro de los límites estipulados (90-100%), se degrada

aproximadamente un 5% con respecto al valor inicial, mientras que no existe degradación química a la $\lambda=355$ nm. Al final del estudio el nifedipino se degrada casi el doble a la $\lambda=254$ nm que a la $\lambda=355$ nm.

Los resultados de la estabilidad del nifedipino en estado sólido a la acción de la luz del día se encuentran recogidos en la tabla 17.

<i>Tiempo (horas)</i>	<i>Porcentaje de nifedipino sin degradar</i>
0	99,93 \pm 1,23
1	98,94 \pm 1,71
2	89,19 \pm 1,11
3	83,69 \pm 0,51
4	50,74 \pm 1,42
5	47,52 \pm 0,23
6	43,12 \pm 0,65
7	37,00 \pm 0,45
8	33,66 \pm 1,10
24	2,93 \pm 0,84

Tabla 17. Porcentaje de nifedipino presente en las muestras sometidas al estudio de estabilidad bajo la acción de la luz del día.

Como se puede observar, el nifedipino es muy sensible a la degradación producida por la luz del día. En la segunda hora de estudio el principio activo se degrada aproximadamente un 11%, no encontrándose dentro de los límites establecidos (90-100%). El efecto degradativo se produce de forma más acentuada entre las 4 y las 5 horas de ensayo, alcanzándose en este intervalo de tiempo aproximadamente un 33% de degradación. Al finalizar el estudio prácticamente todo el nifedipino se degrada, quedando únicamente un 2,93% de nifedipino sin degradar.

Para corroborar de forma cualitativa la existencia de degradación del nifedipino (materia prima) durante el estudio de estabilidad realizado con las tres fuentes de irradiación empleadas, se utilizan los métodos de cromatografía en capa fina y espectroscopía de absorción infrarroja.

La figura 19 muestra la cromatografía en capa fina de las muestras bajo radiación UV a dos longitudes. Como se puede observar, existe degradación del nifedipino cuando se somete a la radiación UV a una λ de 254 nm partir del segundo día, formándose el derivado de nitrosofenilpiridina. Sin embargo, a la $\lambda=355$ nm solo se aprecia degradación del principio activo en las muestras correspondientes a 14 días de estudio, formándose también el mismo producto de degradación que a la $\lambda=254$ nm.

La intensidad del color de las manchas correspondientes al producto de degradación aumenta a medida que se incrementaba el porcentaje de degradación mientras que, la intensidad de las manchas correspondientes al nifedipino disminuye cuando el porcentaje de degradación es elevado. También, se ha observado una disminución del tamaño de la mancha correspondiente al nifedipino y una aumento del tamaño de la mancha que corresponde al derivado de nitrosofenilpiridina cuando el

proceso de degradación se intensifica. Ambos fenómenos se observan claramente a los 14 días de estudio en las muestras sometidas a la acción de la radiación UV a la $\lambda=254$.

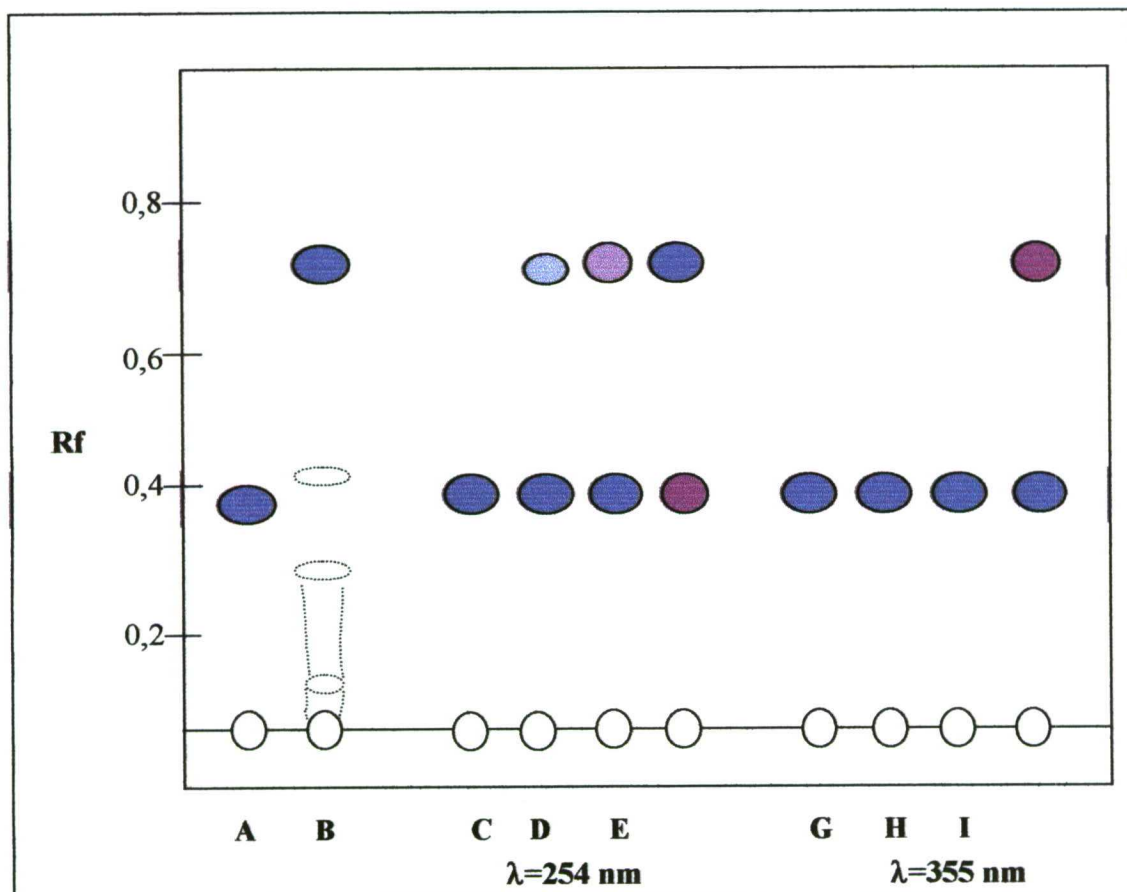


Figura 19. Cromatografía en capa fina del nifedipino materia prima durante el estudio de estabilidad a la radiación UV a la $\lambda=254$ nm y $\lambda=355$ nm. **A:** Nifedipino patrón; **B:** derivado de nitrosofenilpiridina; **C:** después de 1 día de irradiación UV a la $\lambda=254$ nm; **D:** después de 2 días de irradiación UV a la $\lambda=254$ nm; **E:** después de 3 días de irradiación UV a la $\lambda=254$ nm; **F:** después de 14 días de irradiación UV a la $\lambda=254$ nm; **G:** después de 1 día de irradiación UV a la $\lambda=355$ nm; **H:** después de 2 días de irradiación UV a la $\lambda=355$ nm; **I:** después de 3 días de irradiación UV a la $\lambda=355$ nm; **J:** después de 14 días de irradiación UV a la $\lambda=355$ nm.

La figura 20 muestra la cromatografía en capa fina de las muestras sometidas al estudio de estabilidad bajo la acción de la luz del día. A la primera hora de ensayo, a pesar de existir degradación química determinada por espectrofotometría de primera derivada, la formación del derivado de nitrosofenilpiridina no se detecta por cromatografía en capa fina. Para los demás tiempos, se puede observar la formación de este principal producto de degradación.

Las manchas originadas como consecuencia del proceso degradativo son de color más intenso a partir de las 4 horas debido a una mayor degradación del nifedipino. También, se ha observado a partir de las cuatro horas de estudio un aumento del tamaño de las muestras correspondientes al producto de degradación y una disminución del tamaño y la intensidad del color de las manchas pertenecientes al nifedipino.

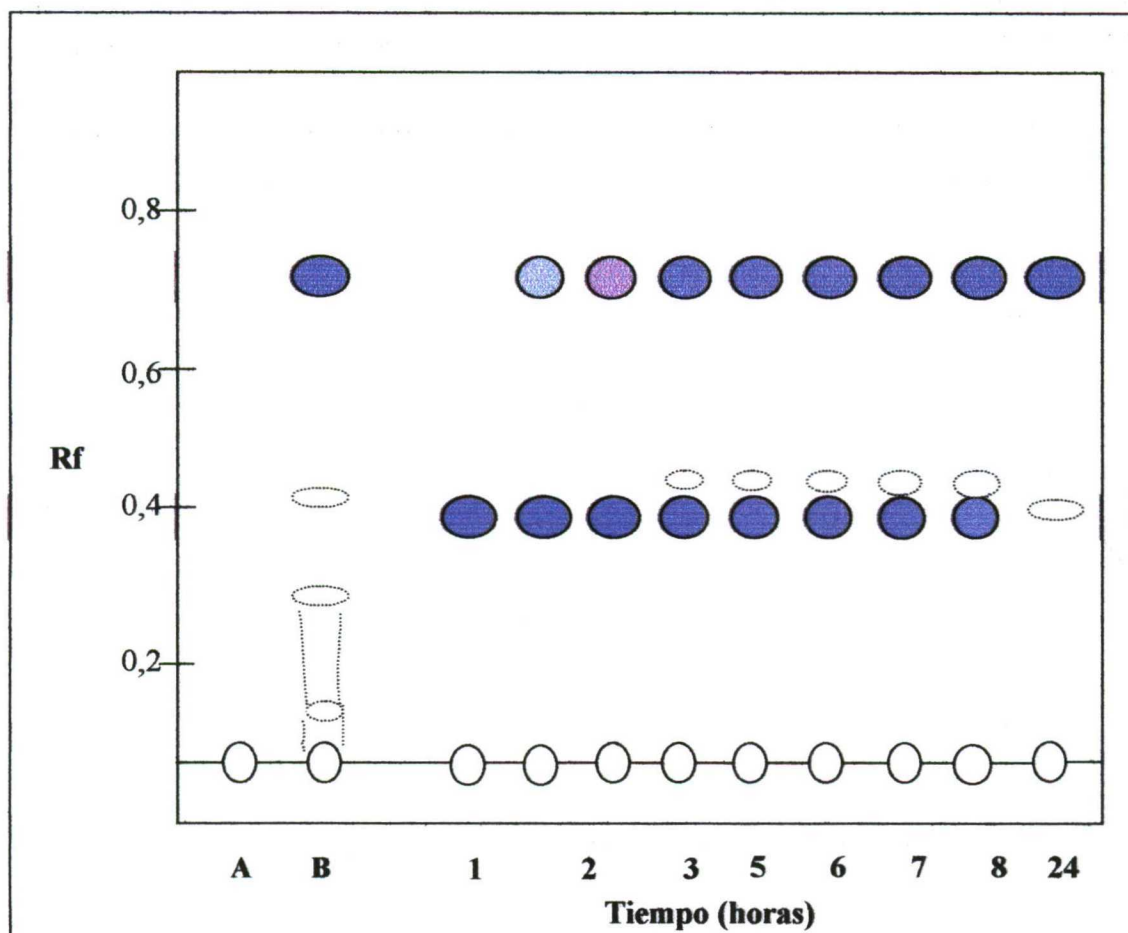


Figura 20. Cromatografía en capa fina del nifedipino materia prima durante el estudio de estabilidad frente a la luz del día durante 24 horas.

Las figuras 21, 22 y 23 muestran los espectros de absorción infrarrojo más representativos del nifedipino bajo la acción de la radiación UV a dos longitudes de onda ($\lambda=254$ nm y $\lambda=355$ nm) y la luz del día.

En la figura 21 se observa que a 1730 cm^{-1} aparece una nueva banda característica de la degradación del nifedipino a los 2 días de exposición a la luz UV ($\lambda=254$ nm), haciéndose cada vez más visible a medida que aumentan los días de exposición a esta longitud de onda. Sin embargo, en la figura 22 la banda de absorción a 1730 cm^{-1} característica de fenómenos de degradación aparece de manera apreciable a partir del día 14 de exposición a la radiación UV a $\lambda=355$ nm. Cuando el principio activo es irradiado con cualquiera de las dos longitudes de onda se aprecia un incremento de la banda de absorción a 1730 cm^{-1} , a la vez que desaparece la banda de absorción a 1660 cm^{-1} .

Los resultados obtenidos están en concordancia con los de $^1\text{D}_{387}$ y cromatografía en capa fina indicando que la degradación es mayor a $\lambda=254$ nm en las condiciones de estudio empleadas.

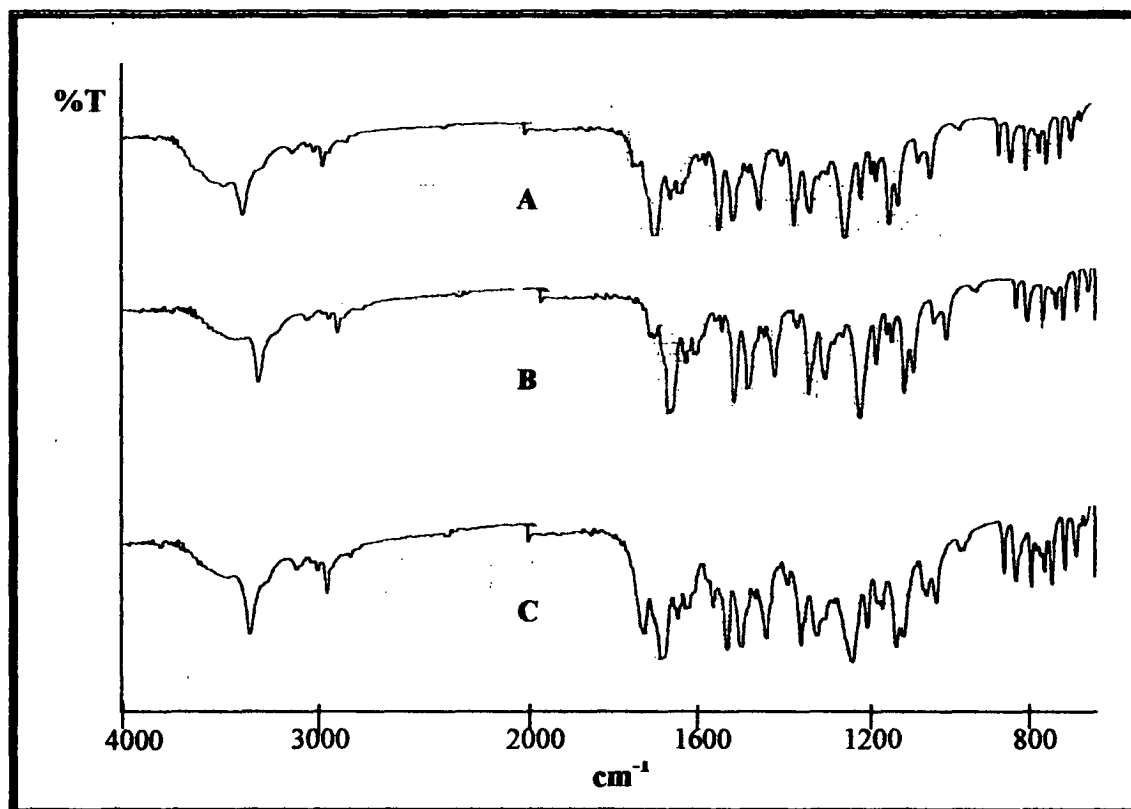


Figura 21. Espectros de absorción infrarrojo del nifedipino expuesto a la $\lambda=254$ nm durante A) 2 días; B) 3 días; C) 14 días.

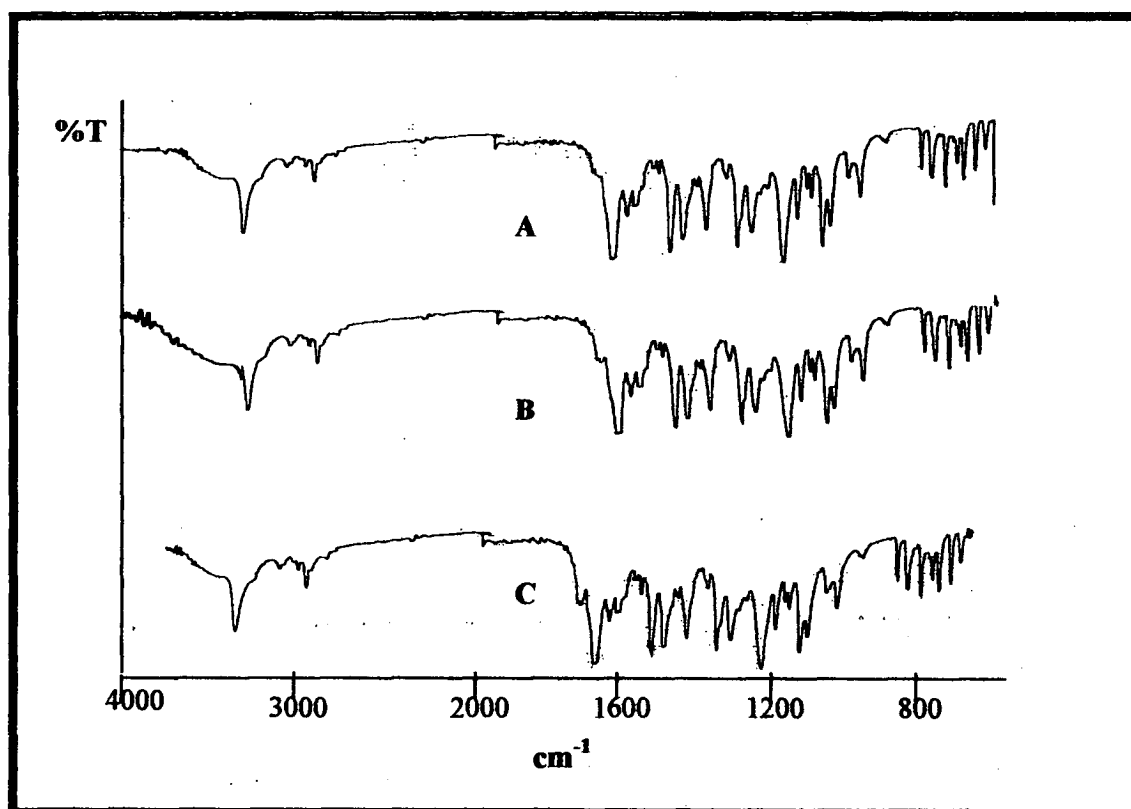


Figura 22. Espectros de absorción infrarrojo del nifedipino expuesto a la $\lambda=355$ nm durante A) 2 días; B) 3 días y C) 14 días.

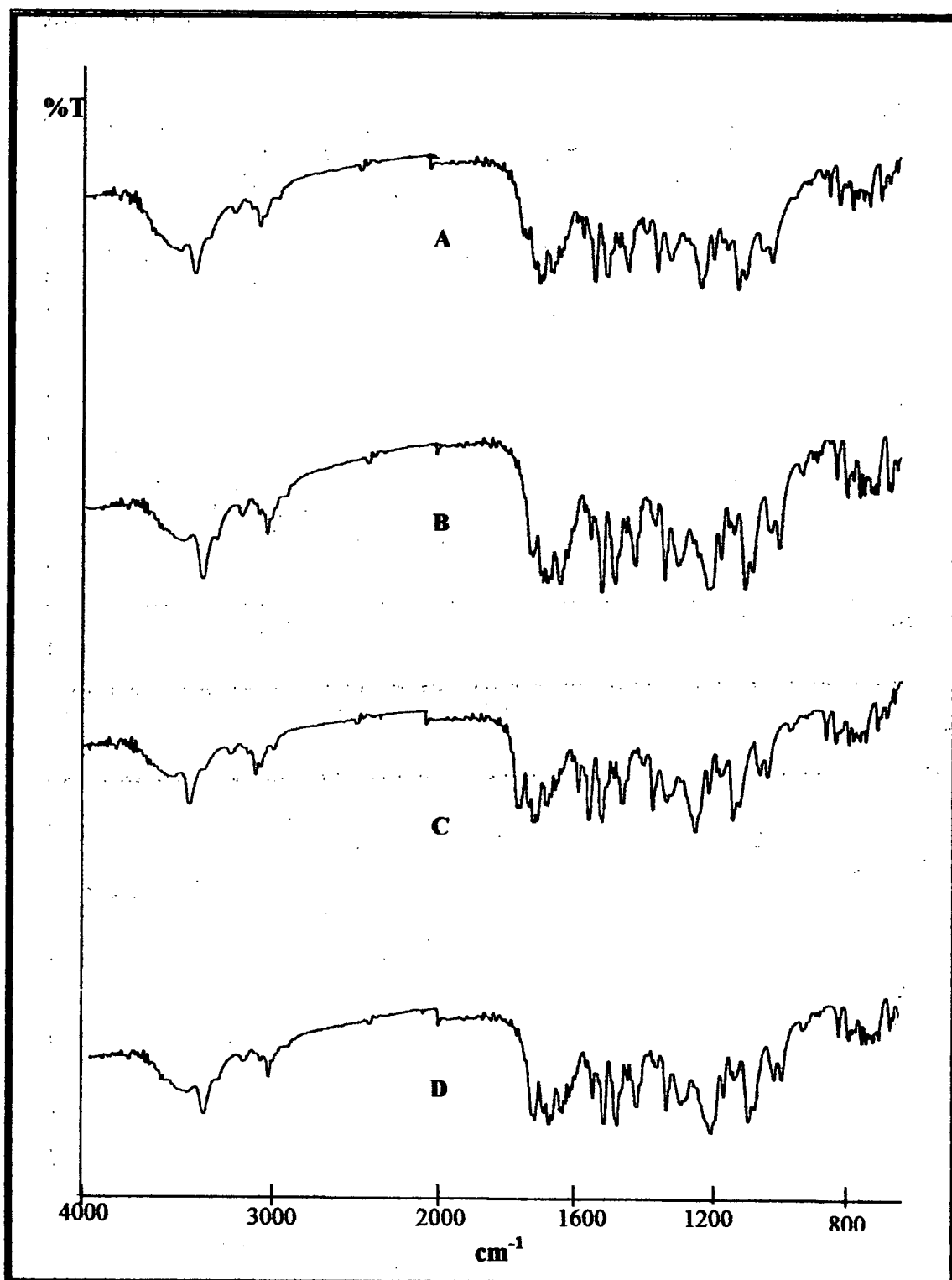


Figura 23. Espectros de absorción infrarrojo del nifedipino expuesto a la luz del día durante A) 1 hora; B) 2 horas; C) 4 horas y D) 24 horas.

Como se puede observar en la figura 23, a la primera hora de exposición a la luz del día no aparece la banda de absorción característica de fotodegradación del nifedipino a 1560 cm^{-1} . A las 4 horas de estudio la banda a 1560 cm^{-1} se aprecia con

bastante claridad, indicando la existencia de un incremento en la degradación del nifedipino. A las 24 horas de estudio esta banda se intensifica de manera considerable. Como ocurre en los estudios de degradación del nifedipino con luz UV, a medida que se degrada el nifedipino por acción de la luz del día se hace más visible la banda a 1730 cm^{-1} y va desapareciendo la banda a 1660 cm^{-1} .

Los resultados obtenidos están en concordancia con los reportados mediante las técnicas de $^1\text{D}_{387}$ y cromatografía en capa fina.

2.- Estabilidad física:

Las observaciones efectuadas, a distintos tiempos, sobre el color de las muestras estudiadas, sometidas a las distintas fuentes de irradiación en los estudios de estabilidad realizados, indican que se produce degradación física en dichas muestras.

En las muestras sometidas a la acción de las radiaciones UV y la luz del día, la degradación física se produce desde el primer día y en la primera hora del estudio, respectivamente. Se observa la aparición de un color amarillo parduzco que se va acentuando a medida que finalizan los ensayos.

4.4.2.2.- Estabilidad de soluciones acuosas de nifedipino de distintos pH a la luz de día

Este estudio tiene como finalidad conocer la influencia del pH de soluciones acuosas de nifedipino sobre su estabilidad, en presencia de un factor crítico como es la luz del día.

- Método:

Se emplean las mismas soluciones tampón y el mismo procedimiento para la preparación de las soluciones acuosas de nifedipino que el descrito en el apartado 4.3.4.

Una vez que se preparan las soluciones, se exponen a la luz del día durante un periodo de 72 horas. Se evalúa el contenido de nifedipino de dichas soluciones por espectrofotometría de primera derivada a distintos tiempos.

El número de muestras analizadas por cada valor de pH a cada tiempo es de 3 ($n=3$) y la temperatura durante todo el ensayo es de 25°C .

- Resultados y comentarios:

En la tabla 18 se recogen los resultados de estabilidad a la luz del día del nifedipino en solución acuosa a distintos pH obtenidos a diferentes tiempos. Como puede observarse en la tabla 18, el nifedipino en solución acuosa es más inestable bajo la acción de la luz del día a pH ácidos extremos ($\text{pH}=1,1$) y a pH alcalinos extremos ($\text{pH}=13,0$), que a cualquier otro valor de pH estudiado. Sin embargo, en solución acuosa a $\text{pH}=13$ el nifedipino se degrada en mayor magnitud, obteniéndose porcentajes de nifedipino a las 72 horas del 19,56%.

Tiempo (horas)	Valores de pH de las soluciones						
	1,1	3,3	5,2	6,9	8,9	11,0	13,0
0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
1	86,16	89,07	93,97	95,79	96,66	93,61	81,53
	±0,15	±1,29	±1,04	±0,31	±1,51	±0,37	±0,55
8	71,45	76,72	78,05	81,44	82,28	77,27	55,37
	±0,75	±1,07	±0,74	±0,29	±0,47	±0,75	±0,63
24	56,03	56,12	57,83	55,70	55,83	52,17	32,31
	±1,12	±0,58	±0,77	±0,45	±1,16	±0,97	±0,81
30	33,74	42,24	43,66	46,49	47,49	46,49	29,48
	±0,56	±0,56	±0,51	±0,77	±0,58	±0,93	±0,36
48	33,02	38,69	42,95	44,37	45,64	41,52	27,35
	±0,97	±0,31	±0,44	±0,86	±0,11	±0,60	±0,59
72	23,10	30,89	39,40	41,24	42,46	38,69	19,56
	±1,48	±0,96	±0,89	±1,23	±0,29	±0,24	±0,42

Tabla 18. Porcentaje de nifedipino de las muestras valoradas en la determinación de la estabilidad de soluciones acuosas de distintos pH por acción de la luz del día.

A pesar de existir degradación, el intervalo de pH donde el nifedipino presenta mayor estabilidad es el comprendido entre 6,9 y 8,9. En este intervalo de pH, el valor medio de porcentaje de nifedipino es de 41,85%. El pH de máxima estabilidad es de 8,9 con un contenido de principio activo de 42,46%.

Si consideramos los resultados obtenidos hasta las 24 horas, el intervalo de máxima estabilidad de pH se amplía hasta 5,0, con un contenido medio en nifedipino de $57,83 \pm 0,77$. A las 24 horas, a pH=13,0, el contenido de nifedipino (32,31%) sigue siendo significativamente mucho menor que en el resto de los pH estudiados. Los pH de máxima inestabilidad y los intervalos de máxima estabilidad del nifedipino en soluciones acuosas sometidas a la acción de la luz del día son muy similares a los determinados en los estudios de estabilidad en solución a distintos pH en ausencia de luz.

De los resultados obtenidos se puede concluir que el pH de las soluciones influye considerablemente en la estabilidad de las soluciones acuosas de nifedipino, como ya se comentó en el apartado 4.3.4, siendo todavía mucho más determinante en este aspecto cuando las soluciones están sometidas a un factor crítico como es la luz del día.

Así, a pH de máxima inestabilidad que para ambos estudios (en presencia y ausencia de la luz del día) es de pH=13,0 el contenido en nifedipino es tres veces menor cuando esta solución está sometida a la irradiación de la luz del día.

4.5.- Tamaño y forma del nifedipino

- Métodos:

El tamaño de las partículas de nifedipino se determina mediante el recuento de 200 partículas, en base a trabajos realizados con anterioridad por este equipo de investigación (Moreno, 1999), en un microscopio electrónico Reichert. El valor del diámetro volumen / superficie ($d_{v/s}$) se calcula a partir de la siguiente expresión:

$$d_{v/s} = \frac{\sum n_i \cdot d_i^3}{\sum n_i \cdot d_i^2}$$

donde n_i es el número de partículas de nifedipino medidas y d_i el diámetro de dichas partículas medido en el microscopio óptico. Así mismo, se determina la superficie específica (S_e) del principio activo mediante la expresión:

$$S_e = \frac{6}{\rho \cdot d_{v/s}}$$

donde ρ es la densidad real del sólido pulverulento, calculada mediante un picnómetro de Helio Micrometrics Multivolume Pycnometer 1305, a partir de los datos de volumen obtenidos de las muestras. Para ello, se pesan alrededor de 0,5 g de sustancia a analizar, que se introducen en el equipo y valoran por triplicado. La forma del principio activo se observa directamente mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM) JSM 6400, perteneciente al C.A.I. de la Universidad Complutense situado en la Facultad de Ciencias Químicas.

- Resultados y comentarios:

El tamaño de partícula del nifedipino, expresado como $d_{v/s}$, es de 23,63 μm , su densidad real (ρ) de $1,31 \pm 8,8 \cdot 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ y su superficie específica (S_e) de 193,83 $\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$.

La forma del nifedipino se observa en la figura 24.

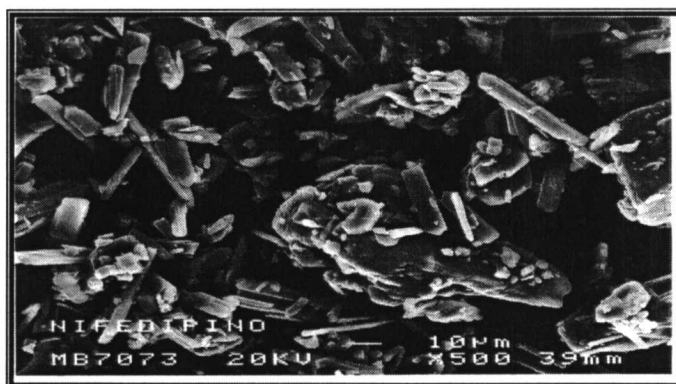


Figura 24. Fotografía SEM del nifedipino a 500 aumentos.

Como puede comprobarse, el nifedipino es una sustancia cristalina, que presenta mayoritariamente formas aciculares que coexisten con algunos cristales que presentan grandes diferencias entre sí en cuanto a su tamaño y forma no definida. Este dato está en concordancia con los resultados obtenidos mediante difracción de rayos X.

CAPÍTULO V. MICROEMULSIONES MÚLTIPLES O/A/O DE NIFEDIPINO

V.- MICROEMULSIONES MÚLTIPLES O/A/O DE NIFEDIPINO.

En este capítulo se describe el desarrollo galénico, la caracterización y los distintos estudios realizados sobre microemulsiones múltiples óleo-acuo-oleosas (o/a/o) de nifedipino, destinadas a la administración transdérmica de dicho fármaco. El trabajo expuesto en este capítulo se considera la parte más relevante de la presente memoria, ya que supone la creación de una formulación completamente nueva, jamás descrita en la bibliografía. Esta formulación podría mejorar muchos de los aspectos negativos de las formas farmacéuticas convencionales de nifedipino como son el efecto de primer paso a nivel hepático, dificultad para mantener niveles plasmáticos constantes, aparición de efectos adversos e incumplimiento posológico.

Aunque se trata de formulaciones novedosas, el desarrollo galénico de las mismas está basado en el de las emulsiones múltiples, descritas ampliamente en la bibliografía (Mishra y Pandit, 1990; Ferreira y cols., 1994a; Sela y cols, 1994; Ferreira y cols., 1995). Es de esperar que las microemulsiones múltiples presenten las mismas características que las emulsiones múltiples en cuanto al tipo de gotículas que las constituyen (Figura 25), capacidad para incorporar moléculas lipófilas o hidrófilas, según el tipo de microemulsión múltiple, y aplicaciones en el campo farmacéutico, de la cosmética o de la agricultura. Además, al igual que ocurre con las microemulsiones simples (o/a y a/o) se pretende que esta formulación se caracterice por presentar un tamaño de gotícula muy pequeño y una gran estabilidad, en comparación con las emulsiones. La inestabilidad de las emulsiones constituye uno de los mayores inconvenientes en este tipo de formulaciones, como se puede comprobar en los trabajos realizados por diferentes autores, dando lugar a una cesión rápida y no controlada de la molécula incorporada (Forster y cols, 1992; Yamaguchi y cols, 1995).

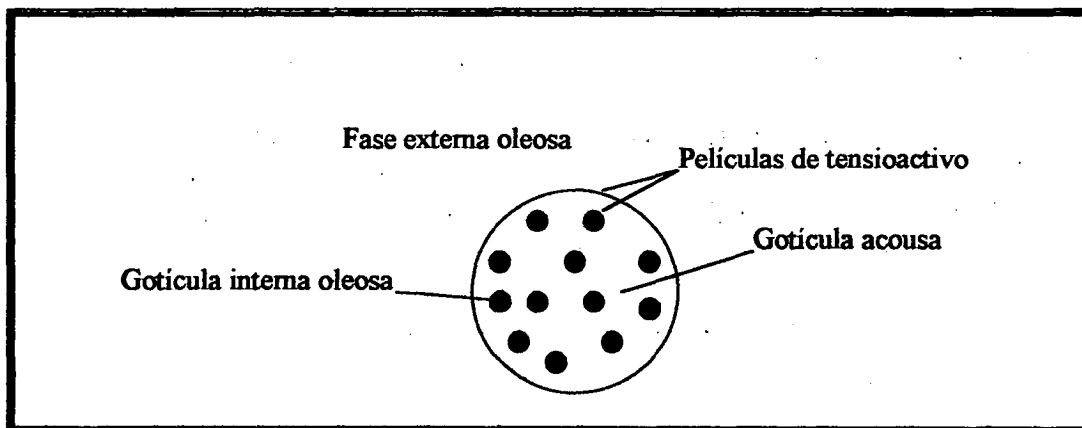


Figura 25. Posible representación esquemática de las gotículas de una microemulsión múltiple o/a/o tomando como referencia la de una emulsión múltiple o/a/o.

Por último, en el desarrollo galénico de las microemulsiones múltiples se intenta que posean dos de las características principales que presentan muchas microemulsiones: 1) capacidad de solubilizar grandes cantidades de fármaco y 2) presentar buenas propiedades como vehículos para la absorción transdérmica de nuestro principio activo.

Además, las microemulsiones múltiples o/a/o permiten incorporar el nifedipino en la fase interna y externa del sistema debido a las características lipófilas de nuestro

principio activo. La presencia de nifedipino en la fase externa de la microemulsión múltiple podría producir una disminución del tiempo de latencia, que aparece durante los primeros tiempos de ensayo, cuando se emplean algunas microemulsiones (o/a y o/a) u otros tipos de formas farmacéuticas de administración transdérmica.

El desarrollo galénico de microemulsiones múltiples o/a/o se realiza siguiendo un proceso de dos etapas, del mismo modo que se formulan dos microemulsiones por separado: 1ª) formación de una microemulsión primaria o/a que presenta características adecuadas en cuanto a estabilidad y tamaño de gotícula y 2ª) utilización de la primera microemulsión como fase acuosa en una simple microemulsión a/o.

5.1. Microemulsiones primarias o/a de nifedipino

El primer paso en la obtención de la microemulsión primaria de nifedipino consiste en el desarrollo galénico de sistemas basados en miristato de isopropilo (IPM), agua y en la utilización de dos tensioactivos no-iónicos como son: el Tween® 80 y el Brij® 96.

En este apartado el objetivo principal es la obtención de microemulsiones o/a con el mayor porcentaje de fase interna para incorporar la mayor cantidad posible de nifedipino. La concentración de principio activo que se pretende incorporar en la microemulsión primaria debe ser aquella que permita el desarrollo galénico de microemulsiones múltiples con una dosis adecuada de nifedipino (40 mg) para su administración transdérmica (McDaid y Deasy, 1996). Una vez seleccionados los sistemas adecuados para nuestro propósito se procede a su caracterización.

5.1.1.- Determinación del volumen molecular del miristato de isopropilo

El IPM ó 1-metiletil tetradecanoato, es un líquido claro, incoloro y prácticamente inodoro, compuesto por ésteres de 3-propanol y ácidos grasos saturados de elevado peso molecular, principalmente ácido mirístico. Presenta un peso molecular de 270,51, su fórmula empírica corresponde a $C_{17}H_{34}O_2$ y su fórmula estructural aparece reflejada en la figura 26.

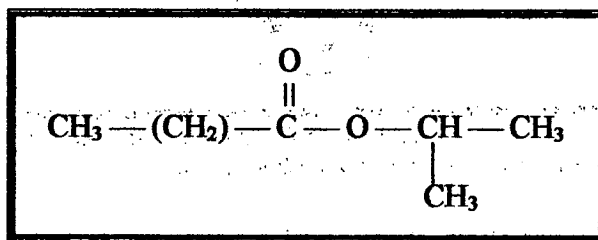


Figura 26. Fórmula estructural del IPM.

Desde el punto de vista de sus propiedades físico-químicas, el IPM es un compuesto miscible con acetona, cloroformo, etanol, acetato de etilo, grasas, alcoholes grasos, aceites de síntesis, hidrocarburos líquidos, tolueno y ceras, siendo prácticamente insoluble en glicerina, propilenglicol y agua. Su punto de ebullición es de unos 140°C, a

una presión de 2 mmHg, y el de congelación a unos 3°C, siendo su viscosidad dinámica a 25°C de 5-7 centipoises.

El IPM presenta numerosas aplicaciones dentro del campo de la tecnología farmacéutica como emoliente, vehículo oleoso, exaltador de la permeabilidad y solvente, apareciendo por ello en numerosos preparados farmacéuticos tópicos y en formulaciones cosméticas, siendo su gran estabilidad y resistencia frente a la oxidación, hidrólisis y fenómenos de enranciamiento, así como su prácticamente nula toxicidad subcutánea e irritabilidad (Handbook, 1994). Estas propiedades le convierten en una candidato idóneo para ser utilizado en formas farmacéuticas de administración transdérmica, y por lo que se ha seleccionado como componente de nuestra formulación.

La determinación de su volumen molecular es de gran importancia para poder predecir de manera cualitativa la cantidad de miristato de isopropilo que se puede incorporar en las microemulsiones o/a constituidas que emplean como tensioactivos no iónicos el Brij® 96 y Tween® 80. También, el volumen molecular del aceite empleado influye considerablemente en la temperatura de inversión de fases (PIT) de las microemulsiones o/a, como se verá posteriormente.

- Método:

El volumen molecular del miristato de isopropilo se calcula teóricamente sumando las contribuciones en el volumen de cada uno de los grupos que lo constituyen. Estos valores son obtenidos a partir de los calculados por Malcolmson y cols. (1998) para la determinación del volumen molecular de un gran número de aceites, entre los que se encuentran aceites con un grupo éster como el que presenta el IPM. Los volúmenes de cada uno de los grupos empleados son los siguientes:

Grupo funcional	Volumen (Å)
CH ₃	55
-CH ₂ -	44
-CH-	17
COO ⁻	14

Tabla 19. Volúmenes de los grupos funcionales del miristato IPM.

- Resultados y comentarios:

El miristato de isopropilo presenta un volumen molecular de 530 Å. Este valor es similar al obtenido para el tributirín (520 Å) por Malcolmson y cols. (1998). Estos autores consideran que este aceite presenta un volumen molecular con un valor intermedio con relación a aquellos que tienen volumen molecular grande como el Migliol 812 (925 Å) y el oleato de etilo (600 Å) y los que presentan volumen molecular pequeño como el heptano (235 Å) y etil caprilato (340 Å).

Por lo tanto, basándonos en los datos de volumen molecular reportados en la bibliografía para otros aceites, podemos considerar que el miristato isopropilo es un aceite con volumen molecular medio. Este resultado indica que el miristato de isopropilo, al igual que los aceites con pequeño volumen molecular, penetra en las

cadena hidrófoba del tensioactivo (Brij® 96 o Tween® 80) localizado en la interfaz de la microemulsión, en mayor grado que aquellos aceites con mayor volumen molecular (Migliol 812 y oleato de etilo), favoreciendo la formación de microemulsiones o/a (Malcolmson y cols., 1998).

5.1.2.-Determinación de la polaridad relativa del miristato de isopropilo

Se lleva a cabo para conocer la polaridad del aceite empleado en el desarrollo galénico de las microemulsiones. Este dato es de gran importancia ya que nos permite evaluar el posible efecto que puede tener dicha polaridad en el grado de incorporación del aceite en las microemulsiones o/a constituidas por tensioactivos no-iónicos (Brij® 96 y Tween® 80) y en la solubilidad del principio activo.

- Método:

Utilizando el método de Kahlwiet y cols. (1983) se estima la polaridad relativa del IPM. Este método se basa en determinar la partición de una serie de cotensioactivos de diferente polaridad entre el IPM y el agua a 25°C.

Los cotensioactivos empleados son los que se citan a continuación en orden de menor a mayor polaridad: butanol < etilenglicol monobutil éter < dietilenglicol monobutil éter < trietilenglicol monobutil éter. Estos cotensioactivos se adicionan (25 %) a volúmenes iguales de IPM y agua y se someten a agitación en vórtex durante 5 minutos a 2000 r.p.m. hasta alcanzar el equilibrio (saturación en ambas fases). Una vez que se alcanza el equilibrio se mide el volumen relativo de las distintas fases.

- Resultados y comentarios:

Para poder comparar la polaridad del IPM con las de otros aceites determinadas en el estudio realizado por Malcolmson y cols. (1998), se emplea la misma designación que utilizaron para describir los distintos comportamientos observados. La designación empleada es la siguiente: 1) sistemas en los que la fase inferior (acuosa) es mayor que la fase superior (oleosa), por lo tanto el cotensioactivo reside principalmente en la fase oleosa, se designan como *A*, 2) sistemas en los que la fracción de volumen de la fase superior es mayor que el de la fase inferior, por lo tanto el cotensioactivo reside principalmente en la fase oleosa, se designan como *B*, 3) sistemas con igual fracción de volumen de la fase oleosa y acuosa se designan como *C* y 4) sistemas en los que aparecen tres tipos de fases en los que el cotensioactivo reside principalmente en la mitad de la fase oleosa y acuosa.

El ensayo realizado por Malcolmson y cols. (1998) clasifica los distintos aceites en función de su polaridad según las siguientes consideraciones: 1) para un mismo cotensioactivo, a medida que aumenta la polaridad de un aceite se incrementa la partición del cotensioactivo empleado en dicho aceite y 2) para un mismo aceite a medida que aumenta la polaridad del cotensioactivo también lo hace su partición hacia la fase acuosa. Así, para el IPM se observan los siguientes comportamientos (Tabla 20).

Fases	Cotensioactivos			
	<i>Butanol</i>	<i>Etilenglicol monobutil éter</i>	<i>Dietilenglicol monobutil éter</i>	<i>Trietilenglicol monobutil éter</i>
<i>IPM (ml)</i>	15	14	12	10
<i>Agua (ml)</i>	10	11	13	15
Comportamiento	<i>B</i>	<i>B</i>	<i>A</i>	<i>A</i>

Tabla 20. Determinación de la polaridad del IPM en función de la partición de cotensioactivos de distinta polaridad hacia la fase oleosa o la acuosa.

De los resultados obtenidos en la tabla 20 podemos deducir que el IPM es un aceite que presenta cierta polaridad, como indica el hecho de que el butanol y el etilenglicol monobutil éter particionan hacia este aceite.

Si comparamos la polaridad que se estima para el IPM con las determinadas por Malcomson y cols. (1998) para un gran número de aceites, clasificados de mayor a menor polaridad, podemos decir que el IPM presenta una polaridad intermedia: butirato de etilo > caprilato de etilo > tributirín > etiloleato ≈ **IPM** > 1-hepteno > Migliol 812 > heptano > hexadeceno > aceite de soja.

5.1.3. Microemulsiones primarias o/a constituidas por IPM, Tween® 80 y agua

5.1.3.1.- Componentes de las microemulsiones primarias o/a

A- Fase Oleosa:

Constituye la fase interna de nuestros sistemas dispersos, y como componente se selecciona el miristato de isopropilo (IPM), descrito de forma detallada en el apartado 5.1.1 de esta memoria.

B - Fase Acuosa:

Constituye la fase externa de las microemulsiones primarias, y se utiliza agua bidestilada desionizada ultrapura, obtenida mediante un equipo de filtración Millipore Milli-Q Plus. De este modo evitamos la ausencia de posibles iones catalizadores de reacciones de degradación no deseables para la estabilidad del sistema disperso.

C - Tensioactivo:

Debido a la toxicidad de la mayoría de los tensioactivos y cotensioactivos empleados en la formulación de preparados tópicos, se selecciona el Tween® 80, tensioactivo no iónico, como único componente en la formulación con capacidad surfactante, debido a su baja irritabilidad, alta estabilidad química y a su frecuente utilización en distintas formas farmacéuticas.

El Tween® 80, también denominado Polioxietilen 20 sorbitán mono-oleato ó polisorbato 80, es un tensioactivo no iónico derivado del polioxietilen-sorbitán

monoéster. Presenta un peso molecular de 1310, su fórmula empírica corresponde a $C_{64}H_{124}O_{26}$ y su fórmula estructural aparece reflejada en la figura 27.

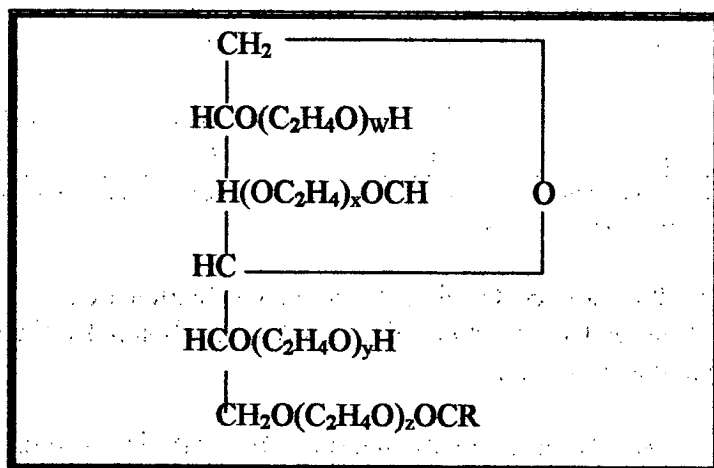


Figura 27. Fórmula estructural del Tween® 80.

El polisorbato 80, a 25°C, es un líquido oleaginoso amarillento con olor característico, soluble en agua y etanol e insoluble en aceites vegetales y minerales.

Si consideramos las demás propiedades físicas el Tween® 80 presenta un valor de pH, en solución acuosa al 5% p/v, comprendido entre 6,0 y 8,0, su viscosidad dinámica es de 425 mPa·s y su peso específico (25°C) de 1,08, siendo sus índices de acidez y saponificación de 2,0 y 45-55, respectivamente. Por último, el Tween® 80 presenta un valor de HLB de 15,0 por lo que es muy utilizado como tensioactivo para la obtención de sistemas dispersos de fase externa acuosa (o/a).

Es una sustancia estable a los electrolitos y la acción de ácidos y bases débiles, sufriendo un fenómeno de saponificación gradual por la acción de los ácidos y las bases fuertes. Debe conservarse en contenedores cerrados, protegidos de la luz, en lugares frescos y secos.

Desde el punto de vista de su seguridad, el Tween® 80 se considera como un material no tóxico y no irritante, lo que permite su administración en humanos hasta un total de 25 mg/kg/día. Este hecho, hace que sea ampliamente utilizado en la industria farmacéutica con la categoría funcional de emulsificante, tensioactivo no iónico, agente solubilizante y agente humectante en numerosas formas farmacéuticas, incluyendo a aquellas destinadas a la administración transdérmica, tal y como se recoge en la guía de excipientes de la FDA y en distintas farmacopeas.

5.1.3.2.- Diseño de microemulsiones primarias o/a

Para determinar la composición de las microemulsiones, se construyó el diagrama de fases con los componentes de la formulación y se delimitó el área de formación correspondiente a estos sistemas. Los diagramas de fases ternarios se representan por medio de triángulos equiláteros en cuyos vértices se sitúan los componentes del sistema expresados como porcentaje (%) en peso.

La figura 28 muestra un diagrama de fases ternario para un sistema constituido por fase acuosa, fase oleosa y tensioactivo.

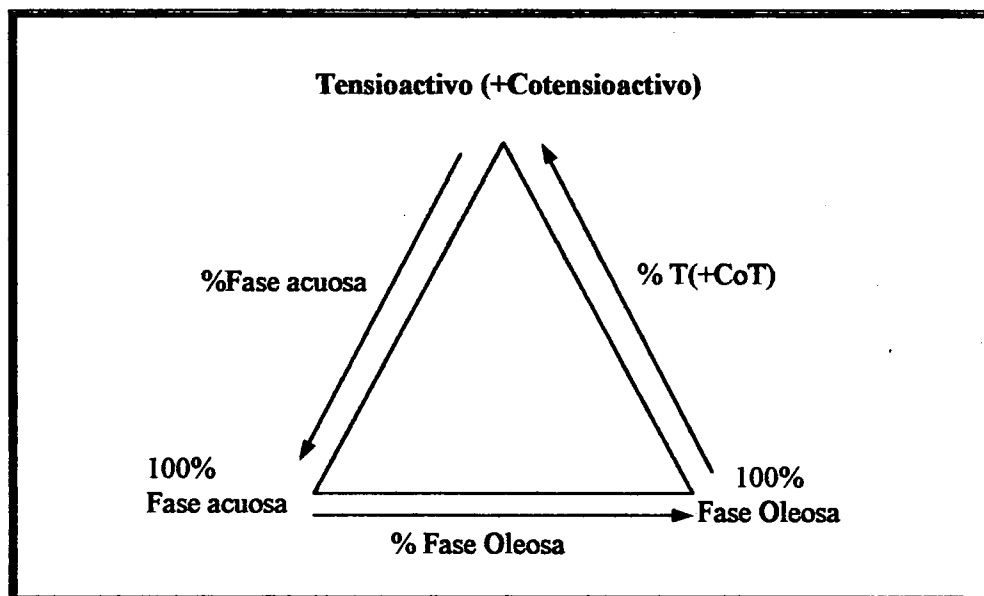


Figura 28. Representación de diagrama de fases ternario (pseudo-ternario).

Como se puede observar, los vértices del diagrama representan el 100% en peso de cada uno de los componentes del sistema. Para aquellas microemulsiones que presentan en su composición un cotensioactivo, dicho componente se sitúa en el vértice superior del triángulo, en una proporción fija (normalmente p/p) con respecto al tensioactivo, dando lugar a los llamados diagramas de fases pseudo-ternarios, también representados en la figura 28.

- Método:

Para la construcción de los diagramas de fases, se sigue el método desarrollado por Aboofaceli y cols., (1993). Según este método, se pesan cantidades apropiadas de Tween® 80 e IPM que se mezclan y agitan hasta obtener una dispersión clara y homogénea.

Posteriormente, las muestras anteriores se valoran volumétricamente a 25°C con la fase acuosa del sistema, agitándose las mezclas resultantes el tiempo suficiente hasta alcanzar el equilibrio.

Finalmente, los sistemas obtenidos se analizan visualmente y a través de prismas de Nicols (cristales polarizados) para evaluar su comportamiento frente a la luz polarizada. Aquellos sistemas ópticamente transparentes, isotrópicos y homogéneos se consideran microemulsiones y su composición se marca dentro del diagrama de fases para delimitar así el área de formación de microemulsiones con la misma composición cualitativa. La estabilidad de las microemulsiones constituidas se evalúa durante un mes.

Además, se realizan los siguientes ensayos cualitativos para determinar el signo

La figura 28 muestra un diagrama de fases ternario para un sistema constituido por fase acuosa, fase oleosa y tensioactivo.

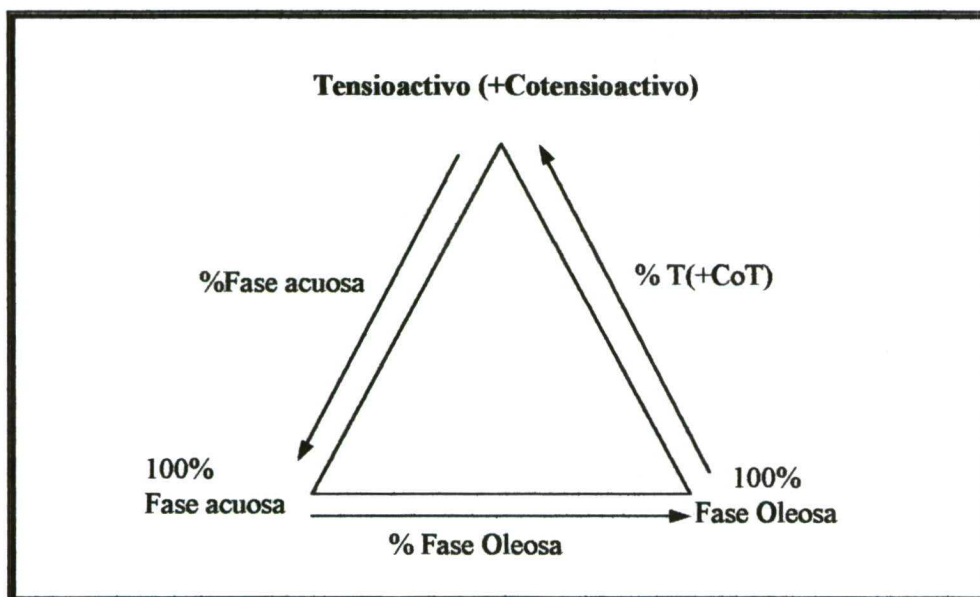


Figura 28. Representación de diagrama de fases ternario (pseudo-ternario).

Como se puede observar, los vértices del diagrama representan el 100% en peso de cada uno de los componentes del sistema. Para aquellas microemulsiones que presentan en su composición un cotensioactivo, dicho componente se sitúa en el vértice superior del triángulo, en una proporción fija (normalmente p/p) con respecto al tensioactivo, dando lugar a los llamados diagramas de fases pseudo-ternarios, también representados en la figura 28.

- Método:

Para la construcción de los diagramas de fases, se sigue el método desarrollado por Aboofaceli y cols., (1993). Según este método, se pesan cantidades apropiadas de Tween® 80 e IPM que se mezclan y agitan hasta obtener una dispersión clara y homogénea.

Posteriormente, las muestras anteriores se valoran volumétricamente a 25°C con la fase acuosa del sistema, agitándose las mezclas resultantes el tiempo suficiente hasta alcanzar el equilibrio.

Finalmente, los sistemas obtenidos se analizan visualmente y a través de prismas de Nicols (cristales polarizados) para evaluar su comportamiento frente a la luz polarizada. Aquellos sistemas ópticamente transparentes, isotrópicos y homogéneos se consideran microemulsiones y su composición se marca dentro del diagrama de fases para delimitar así el área de formación de microemulsiones con la misma composición cualitativa. La estabilidad de las microemulsiones constituidas se evalúa durante un mes.

Además, se realizan los siguientes ensayos cualitativos para determinar el signo

Todas las microemulsiones representadas en el diagrama de fases son estables durante al menos un mes. Los ensayos de dilución y solubilización del colorante demuestran que las microemulsiones desarrolladas son de tipo acuó-oleosas (o/a).

5.1.4.- Microemulsiones primarias o/a constituidas por IPM/Brij® 96/agua

Debido a la poca proporción de fase interna que se puede incorporar en los sistemas IPM/ Tween® 80/agua, se plantea la posibilidad de cambiar de tensioactivo. Para este propósito se utiliza como tensioactivo Brij® 96 ya que se trata, al igual que el Tween® 80, de un tensioactivo no iónico y por lo tanto presenta baja irritabilidad y alta estabilidad química. Además, el Brij® 96 es capaz de formar grandes áreas de microemulsiones sin la ayuda de cotensioactivos y las microemulsiones formadas pueden ser diluidas infinitamente (Ho y cols., 1996).

5.1.4.1.- Componentes de la microemulsión primaria o/a

A- Fase Oleosa:

Constituye la fase interna de nuestros sistemas dispersos, y como componente se selecciona el miristato de isopropilo (IPM), descrito de forma detallada en el apartado 5.1.1 de esta memoria.

B - Fase Acuosa:

Constituye la fase externa de las microemulsiones primarias, y se utiliza agua bidestilada desionizada ultrapura, obtenida mediante un equipo de filtración Millipore Milli-Q Plus. De este modo, evitamos la ausencia de posibles iones catalizadores de reacciones de degradación no deseables para la estabilidad del sistema disperso.

C - Tensioactivo:

El Brij® 96, también denominado polietilenglicol monoleil éter, poloxil 10 oleil éter ó decaetoxi oleil éter, es un tensioactivo no iónico derivado de los éteres de polioxietilen. Presenta un peso molecular de 709, su fórmula empírica corresponde a $C_{18}H_{35}(OCH_2CH_2)_{10}OH$.

El Brij® 96, a 25°C, es un semisólido de color amarillo con olor característico, soluble en agua y etanol e insoluble en propilenglicol, aceites vegetales y minerales. Si se consideran las demás propiedades físicas, el Brij® 96 presenta un valor de viscosidad dinámica de 100 mPa·s y un peso específico (25°C) de 0,9, presentando un valor máximo de acidez de 0,89. El Brij® 96 presenta un valor de HLB de 12,4 por lo que es muy utilizado como tensioactivo para formular sistemas dispersos de fase externa acuosa (o/a).

Es una sustancia estable en condiciones extremas básicas y ácidas. Puede sufrir autooxidación durante el proceso de almacenamiento dando lugar a la formación de

peróxidos y aumentando su acidez. Debe conservarse en recipientes herméticamente cerrados y en lugares fríos y secos.

Desde el punto de vista de su seguridad, el Brij® 96 se considera como un material no tóxico y no irritante. La toxicidad aguda por vía oral en rata (L_{D50}) es de 2.700 mg. Se utiliza con la categoría funcional de emulsificante, tensioactivo no iónico, agente solubilizante y agente humectante en numerosas formas farmacéuticas, incluyendo a las destinadas a la administración transdérmica, tal y como se recoge en distintas farmacopeas.

5.1.4.2.- Diseño de microemulsiones primarias o/a

Para determinar la composición de las microemulsiones, se construyen los diagramas de fases ternarios con los componentes de la formulación y se delimita el área correspondiente a estos sistemas.

- Método:

Para la construcción de los diagramas de fases, se sigue el método desarrollado por Aboofaceli y cols., (1993). El procedimiento de este método se ha descrito en el apartado 5.1.3.2.

Los sistemas obtenidos se analizan visualmente y a través de prismas de Nicols (cristales polarizados) para evaluar su comportamiento frente a la luz polarizada. Aquellos sistemas ópticamente transparentes, isotrópicos y homogéneos se consideran como microemulsiones y su composición se marca dentro del diagrama de fases para delimitar así el área de formación de microemulsiones con la misma composición cualitativa. La estabilidad de las microemulsiones constituidas se estudia durante un mes.

Se realizan los siguientes ensayos cualitativos para determinar el signo de la microemulsión, al igual que se hizo en el apartado 5.1.3.2: 1) ensayo de dilución y 2) ensayo de solubilidad de un colorante en la fase continua.

- Resultados y comentarios:

El diagrama de fase ternario y el área de formación de las microemulsiones constituidas por IPM/Brij® 96/agua aparecen representado en la figura 30. En el diagrama de fases se delimitan en el diagrama distintas regiones correspondientes a áreas de formación de distintos sistemas en función del porcentaje de sus componentes. Así, se puede observar una región delimitada en azul correspondiente a un área de formación de sistemas de tipo gel (G) de gran viscosidad, una región delimitada en color verde correspondiente a un área de formación de emulsiones (E) procedentes de sistemas tipo microemulsión enturbiados con el paso del tiempo (24 horas), una región delimitada en color púrpura correspondiente a un área de coexistencia de fases separadas y emulsión (FS), y finalmente una región delimitada en rojo correspondiente a un área de formación de microemulsiones (ME), objeto de nuestro estudio.

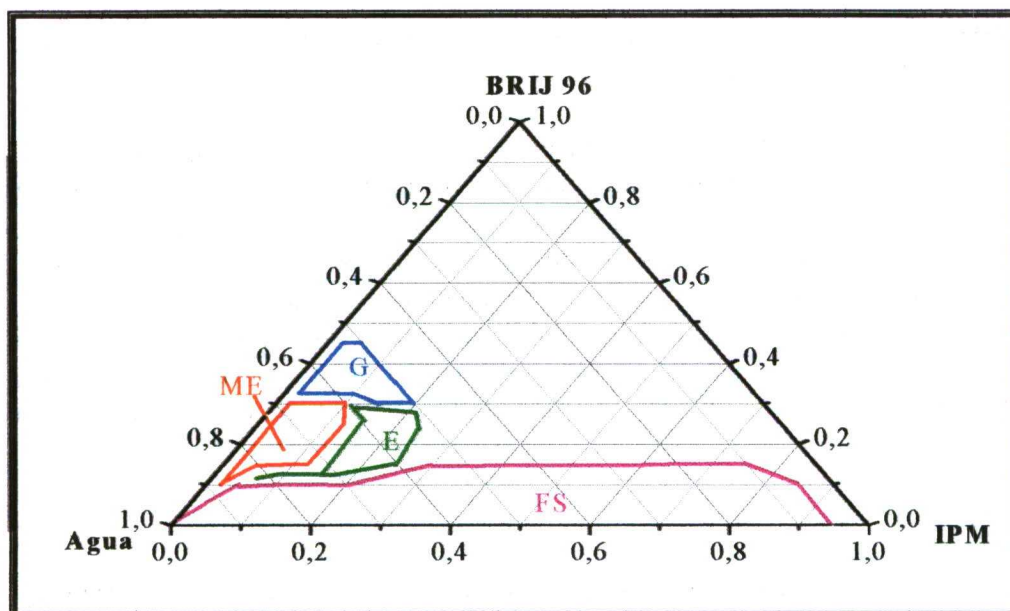


Figura 30. Diagrama ternario de fases y áreas de formación de sistemas constituidos por IPM/Brij® 96/agua.

El empleo del tensioactivo no iónico Brij® 96, para el desarrollo de microemulsiones o/a, permite incorporar hasta un 12,5% (p/p) de fase interna (IPM) para un contenido en tensioactivo del 15-25% (p/p). La mínima cantidad incorporada de IPM para que se consideren como microemulsiones es del 2,5% para una proporción de tensioactivo de 10%. Los sistemas cuyos contenidos en fase interna son menores del 2,5% no se consideran microemulsiones y se denominan soluciones micelares.

Todas las microemulsiones representadas en el diagrama de fases son estables durante al menos un mes. Los ensayos de dilución y solubilización del colorante demuestran que las microemulsiones son de tipo óleo-acuosa (o/a).

A la vista de los resultados obtenidos y al compararlos con los de las microemulsiones constituidas por IPM/ Tween® 80/agua, se puede concluir que el Brij® 96 origina una mayor área de formación de microemulsiones y permite incorporar 2,5 veces más de fase interna (IPM) empleando porcentajes de tensioactivos mucho menores. Por todo esto, se selecciona el Brij® 96 como tensioactivo no iónico para el desarrollo galénico de las microemulsiones primarias o/a.

5.1.4.3.- Determinación de la temperatura de inversión de fases en microemulsiones primarias o/a

La temperatura de inversión de fases (PIT) se puede definir como la temperatura a la cual una emulsión o microemulsión de tipo óleo-acuosa (o/a) cambia a una emulsión o microemulsión tipo acuo-oleosa (a/o) o viceversa. El PIT en este tipo de sistemas está íntimamente relacionado con el punto de turbidez o "cloud point" de los tensioactivos. Una característica de soluciones acuosas de tensioactivos no-iónicos es la capacidad de enturbiamiento que presentan cuando se calientan a una determinada temperatura. La temperatura a la que ocurre este fenómeno (PIT o punto de turbidez del

tensioactivo) depende de la concentración y generalmente aumenta a medida que se incrementa la concentración del tensioactivo no-iónico.

El fenómeno de inversión de fases se encuentra limitado únicamente a los sistemas dispersos anteriormente mencionados constituidos por tensioactivos derivados del polietilenglicol tipo éter, como es el caso del Brij® 96. La solubilidad de estos tensioactivos depende de la formación de puentes de hidrógeno entre el agua y los átomos de oxígeno de un grupo éter. Cuando estos puentes se rompen o se desestabilizan por acción del calor la solubilidad del tensioactivo disminuye. Por lo tanto, el PIT representa la temperatura a la cual este fenómeno ocurre. La determinación de este parámetro es de gran importancia para establecer la manera en la que el aceite se incorpora en la microemulsión.

- Método:

El punto de turbidez (CP) y la temperatura de inversión de fases (PIT) de las soluciones micelares (Brij® 96/agua) y microemulsiones (IPM/Brij® 96/agua), respectivamente, se determinan calentando los sistemas a un intervalo de temperatura de 1°C/min y anotando la temperatura en la cual se produce turbidez en las soluciones micelares y en las microemulsiones. Para determinados sistemas se observa una fase de transición en la cual se forma un gel transparente antes de alcanzar el PIT. Sin embargo, muchas veces es difícil determinar esta fase de transición por lo que se decide anotar la temperatura en la que se produce el punto turbidez en estos sistemas. Los resultados finales obtenidos son la media de tres determinaciones, para cada sistema, de la temperatura a la cual se produce turbidez.

- Resultados y comentarios:

De los resultados obtenidos en este estudio (tabla 21) se puede observar que para las distintas concentraciones de tensioactivos empleados se produce una disminución progresiva del PIT en las microemulsiones, a medida que aumenta la concentración de IPM hasta un contenido en aceite del 3%. Para un 5% de fase interna, el PIT de las microemulsiones aumenta de nuevo.

Concentración de IPM (%)	PIT (°C) a diferentes porcentajes de Brij® 96 (p/p)			
	15	20	25	30
<i>Micelas</i>	62,1±0,14	65,6±0,21	67,1±0,32	66,9±0,17
1	43,3±0,08	47,0±0,19	50,2±0,11	49,6±0,13
2	37,7±0,07	38,0±0,00	38,5±0,21	37,7±0,21
3	36,9±0,07	34,9±0,14	33,7±0,07	31,9±0,14
5	39,3±0,07	38,2±0,14	37,5±0,07	37,1±0,14

Tabla 21. Punto de turbidez y temperatura de inversión de fases de soluciones micelares (Brij® 96 /agua) y microemulsiones o/a (IPM/ Brij® 96 /agua) conteniendo distintos porcentajes (p/p) de IPM y Brij® 96.

Estos resultados están en concordancia con los obtenidos en la literatura para otros tipos de aceites con parecido volumen molecular (Malcolson y cols., 1998). Basándonos en estos, podemos decir que la disminución del PIT en los sistemas dispersos estudiados se debe a que el IPM, cuyo volumen molecular es de 530 Å, penetra en la interfaz de la monocapa de tensioactivo formando estructuras asimétricas que son las responsables de la disminución del PIT.

Para facilitar la interpretación de los resultados es importante destacar que el Brij® 96, en ausencia de aceites, tiene la capacidad de formar principalmente micelas asimétricas más que micelas esféricas. Por lo tanto, cualquier aceite que sea capaz de penetrar en la interfaz de la monocapa de tensioactivo es capaz de favorecer la formación de agregados asimétricos produciendo una disminución del PIT por debajo del de la micela (Malcolson y cols., 1998). Así pues, podemos decir que esta afirmación es verdadera a las concentraciones de tensioactivo empleadas en nuestro estudio, ya que para el intervalo de concentraciones de IPM entre 1 al 3% disminuye el PIT a medida que aumentamos su concentración, lo que es indicativo de su penetración en la interfaz de la monocapa de tensioactivo. La penetración del IPM en la interfaz origina un fenómeno de dilución de la concentración de las cadenas de polioxietilen que se podría traducir en una disminución de la cantidad de nifedipino incorporado.

Sin embargo, con un 5% de IPM se produce un aumento del PIT en los sistemas objeto de estudio. La explicación a este fenómeno podría deberse a una disminución en la incorporación del aceite en la monocapa de tensioactivo dando lugar a la formación de más gotículas esféricas de fase interna y por lo tanto de un núcleo central de IPM. Este núcleo central constituye una zona para la solubilización del principio activo. Por lo tanto, la cantidad de nifedipino incorporado en la microemulsión será menor a medida que aumenta el grado de penetración del aceite en la monocapa del tensioactivo.

5.1.4.4.- Solubilización de nifedipino en soluciones micelares Brij® 96/agua y microemulsiones IPM/ Brij® 96/agua

Este estudio se realiza para demostrar la capacidad de las microemulsiones o/a constituidas por IPM/ Brij® 96/agua de solubilizar e incorporar mayores cantidades de nifedipino que las soluciones micelares de igual composición (solución acuosa de tensioactivo sin aceite). Así pues, si el aceite es capaz de solubilizar al principio activo y formar un núcleo de carácter lipófilo en el interior de las microgotas, en donde el tensioactivo se sitúa en la interfaz con sus cadenas hidrófobas localizadas hacia el interior, se podría esperar un aumento en la cantidad de nifedipino solubilizado en el interior de la microemulsión.

Por lo tanto, la cantidad incorporada de principio activo en las microemulsiones será mucho mayor que en las soluciones micelares debido a la formación de una zona adicional para la solubilización del fármaco.

- Método:

Para realizar este estudio se preparan microemulsiones o/a constituidas por 5%

de IPM y 17,5, 22,5 y 27,5% de Brij® 96, formando parte del área de microemulsiones anteriormente determinada. Las soluciones micelares están constituidas por soluciones acuosas con idéntica concentración de Brij® 96 que las microemulsiones: 17,5, 22,5 y 27,5%. La cantidad incorporada de nifedipino en estos sistemas se determina mediante la adicción de una cantidad conocida de nifedipino (50 mg) a las distintas soluciones micelares y microemulsiones preparadas por triplicado. Todas las muestras estudiadas se mantienen como soluciones transparentes en equilibrio con un exceso de fármaco durante todo el ensayo.

Además, se determina la solubilidad del nifedipino en agua bidestilada desionizada ultrapura, IPM, 1-octadeceno y en soluciones acuosas de dimetoxitetraetilenglicol (DMTG) a distintos porcentajes (20-100%).

Todas las muestras se protegen de la luz y se introducen en un baño de agitación Techne SB-16 con una velocidad constante de 20 r.p.m. y a una temperatura de $25 \pm 0,4^\circ\text{C}$. Después de ocho días, se separa el exceso de fármaco de todas las muestras mediante filtración a través de filtros de acetato de celulosa para solventes acuosos y de filtros hidrófobos de di-fluoruro de polivinilideno, para solventes no acuosos, siendo el tamaño de poro para ambos filtros de $0,22 \mu\text{m}$. Todas las preparaciones se valoran respecto a su contenido en nifedipino, por triplicado ($n=3$), por HPLC después de diluirlas apropiadamente con metanol.

- Resultados y comentarios:

Las cantidades incorporadas (% p/v) de nifedipino en las soluciones micelares y en las microemulsiones se muestran en la tabla 22.

Aceite	% (p/v) de nifedipino incorporado \pm D.E a distintos % (p/p) Brij® 96 en microemulsiones		
	17,5%	22,5%	27,5%
Micelas	0,201 \pm 0,007	0,243 \pm 0,013	0,323 \pm 0,015
IPM	0,231 \pm 0,011	0,301 \pm 0,016	0,383 \pm 0,018

Tabla 22. Incorporación de nifedipino en soluciones micelares y microemulsiones con un 5% (p/p) de IPM a 25°C .

Como se puede observar la cantidad de nifedipino incorporada en las microemulsiones es mayor que en las soluciones micelares y en ambos casos incrementa a mediada que aumenta el porcentaje de Brij® 96. Al realizar un ANOVA, para la misma concentración de tensioactivo ($P < 0,05$), existen diferencias significativas entre la cantidad de nifedipino solubilizada en la microemulsión y la solución micelar.

Para explicar estos resultados, hay que considerar las zonas potenciales de solubilización del principio activo en los sistemas constituidos por Brij® 96. La cantidad disuelta de nifedipino en la fase externa acuosa de los sistemas será muy baja debido a su escasa solubilidad en este medio. Por lo tanto, la casi totalidad del fármaco se encuentra incorporado dentro de la micela o en las gotículas que constituyen la fase interna de la microemulsión. Es importante destacar que, tanto en la micela como en las

gotículas de la fase interna de la microemulsión existen regiones con diferente polaridad.

Las micelas no iónicas originadas por el Brij® 96 están constituidas por un núcleo hidrocarbonado que se encuentra rodeado de un manto de cadenas de polioxietilen. En la zona más próxima al núcleo, el manto está constituido solamente por óxido de polioxietileno puro, mientras que a medida que aumenta la distancia desde el núcleo, las cadenas de polioxietilen están más hidratadas (Elworthy y Patel, 1982).

Además de lo comentado anteriormente para las micelas, en las microemulsiones hay que tener en cuenta la presencia del IPM. Debido a que el IPM presenta volumen molecular intermedio (apartado 5.1.1) puede penetrar parcialmente en las cadenas hidrogenadas del tensioactivo y por lo tanto el núcleo central de la microemulsión o/a está constituido exclusivamente por la cantidad de aceite que no haya penetrado. Así, la cantidad de nifedipino que se podría solubilizar en el núcleo central de la microemulsión es menor de lo que cabría esperar si el IPM presentara un volumen molecular mayor que le impidiera penetrar en las cadenas hidrogenadas del tensioactivo. Alrededor del núcleo de IPM se sitúan los grupos hidrocarbonados lipófilos de la molécula de tensioactivo y finalmente un manto constituido por las cadenas de óxido de etileno cuya hidratación aumenta a medida que se incrementa su distancia desde núcleo.

Para poder ver los posibles lugares de solubilización del nifedipino en las diferentes regiones con distinta polaridad existentes en las soluciones micelares y en la gotículas de la fase interna de las microemulsiones, se utilizan dos compuestos como modelos: 1) el 1 octadeceno se emplea como modelo para representar la región lipófila (9-octadeceno) que constituye el núcleo central de la micela y la región hidrocarbonada que se encuentra rodeando al IPM en las gotículas que constituyen la fase interna de la microemulsión, 2) las soluciones acuosas de DMTG, a distintas concentraciones, sirven como modelo para predecir la solubilidad del nifedipino en la capa hidratada de polioxietileno presente en las soluciones micelares y en las gotículas de la fase interna de las microemulsiones. El DMTG en estado puro se emplea para representar el estado deshidratado de las cadenas de polioxietileno localizadas en la zona más próxima al núcleo hidrocarbonado (Patel y cols., 1981), mientras que las soluciones acuosas de DMTG, a distintas concentraciones, sirven como modelo para representar el aumento de hidratación existente, a medida que disminuye la concentración de DMTG, en las cadenas de polioxietileno según se incrementa la distancia desde el núcleo.

Como puede observarse en la figura 31 la solubilidad del nifedipino aumenta significativamente a medida que lo hace el porcentaje de DMTG. Estos resultados, junto con los datos de solubilidad del nifedipino en 1-octadeceno ($1,51 \cdot 10^{-2} \pm 8,7 \cdot 10^{-3}$ (% p/p)), indican que el nifedipino se va a incorporar principalmente en las cadenas de polioxietileno deshidratado del Brij® 96, que se encuentran localizadas en la zona más próxima al núcleo de la micela (región hidrocarbonada) y de la microemulsión (fase dispersa IPM/región hidrocarbonada). La incorporación del principio activo es menor en la región hidrocarbonada del tensioactivo, en el núcleo de la micela y a medida que se incrementa la hidratación de las cadenas de polioxietileno.

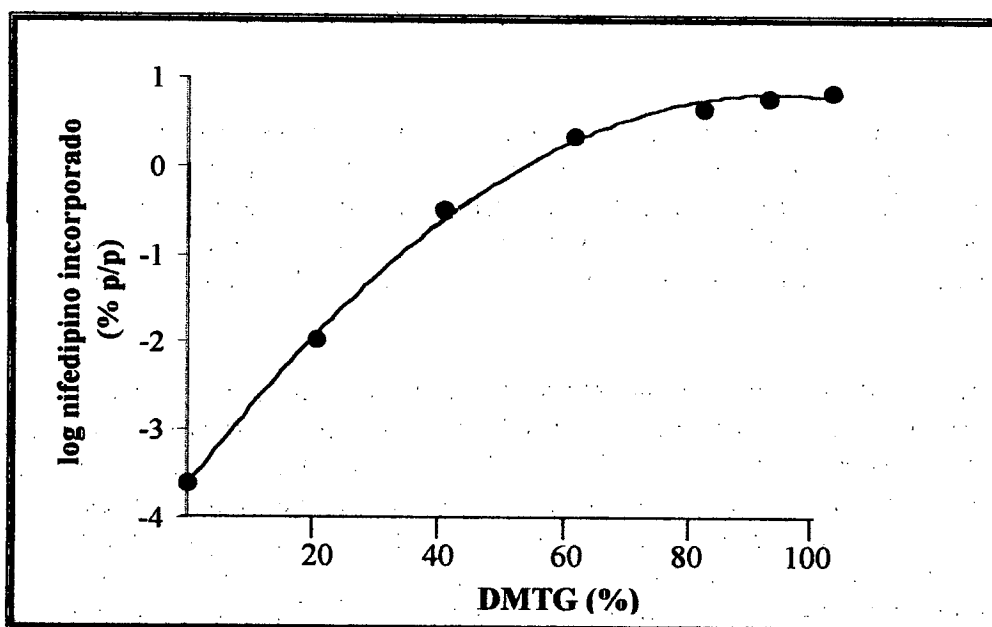


Figura 31. Logaritmo (% p/p) de la cantidad incorporada de nifedipino vs porcentaje (p/p) DMTG.

En la microemulsión existe otro lugar de solubilización del nifedipino, atendiendo la lipofilia del principio activo ($\log P_{\text{act}}=2,50$) y a su solubilidad en IPM ($0,19 \pm 0,03$, % p/v), que es el núcleo de IPM de la microemulsión o/a. Con el porcentaje de IPM incorporado para realizar este estudio (5%) se origina un núcleo lipófilo al disminuir la penetración de IPM en la monocapa del tensioactivo, como se puede deducir del aumento del PIT para este porcentaje de aceite, dando lugar a la formación de más gotículas esféricas de fase interna. Por lo tanto, las microemulsiones constituidas por IPM/Brij® 96/agua incrementan significativamente la solubilización de nifedipino con respecto a las soluciones micelares con equivalente concentración de tensioactivo por dos motivos: 1) formación de un lugar potencial para la solubilización del nifedipino (núcleo hidrofóbico) y 2) aumento de la concentración de las cadenas de polioxietilen (principal foco de solubilización del nifedipino) como consecuencia de la disminución en la penetración del IPM en la monocapa de tensioactivo.

5.1.4.5.- Incorporación de nifedipino a la microemulsión IPM/ Brij® 96/agua

- Método:

Para la incorporación del principio activo se selecciona, dentro del diagrama de fases, la microemulsión con un contenido de un 10% de IPM y del 25% en Brij® 96, al ser este sistema el que presenta la mayor proporción de fase dispersa con el mínimo requerimiento de tensioactivo necesario para su formación.

Para determinar la máxima cantidad de nifedipino incorporado al sistema disperso, se adicionan a las mezclas IPM/Brij® 96 cantidades crecientes de principio activo correspondientes a las concentraciones teóricas de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Una vez dispersado el nifedipino en las mezclas mencionadas, se adiciona la

fase acuosa, manteniéndose el sistema en agitación hasta la formación de la microemulsión. A continuación, se filtran las microemulsiones obtenidas a través de filtros de celulosa de $0,45\ \mu\text{m}$ de tamaño de poro para eliminar el nifedipino en suspensión y por lo tanto no incorporado al sistema.

La cuantificación del principio activo presente en los distintos sistemas se realiza por HPLC, previa disolución de las microemulsiones obtenidas en metanol hasta obtener una concentración teórica de nifedipino de $20\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. El número de muestras estudiadas por concentración es de tres ($n=21$). Los análisis de cada muestra se realizan por triplicado.

- Resultados y comentarios:

La figura 32 muestra los resultados obtenidos en los estudios realizados sobre la incorporación de nifedipino a la microemulsión o/a.

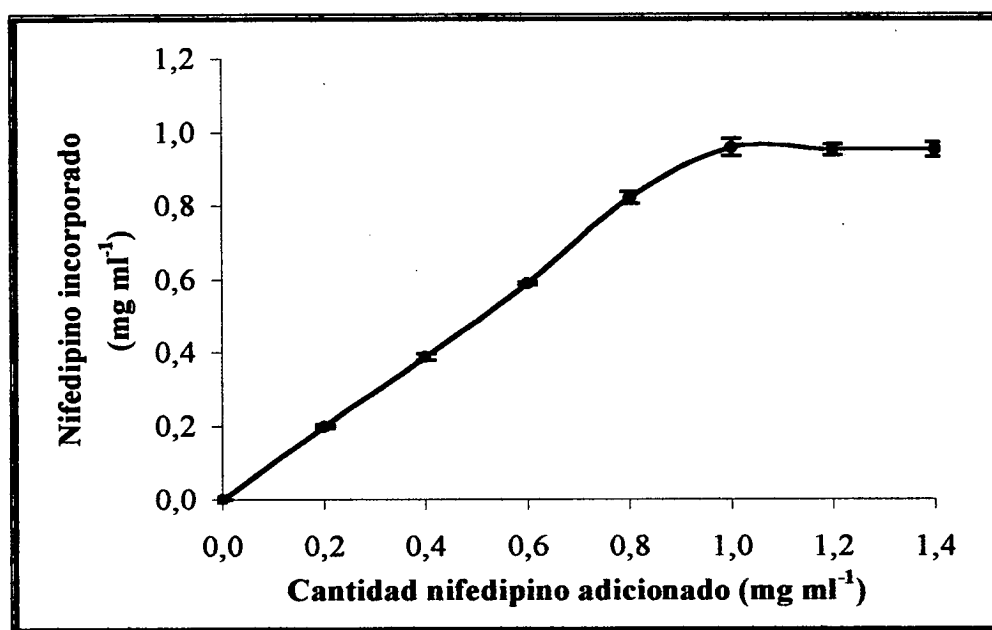


Figura 32. Cantidad de nifedipino incorporado a la microemulsión IPM/Brij[®] 96/agua; 10:25:65 (p/p/p).

Como se puede observar, la máxima cantidad de nifedipino que se pudo incorporar al sistema disperso seleccionado es de $0,96 \pm 0,02\ \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

5.1.5.- Microemulsiones primarias constituidas por IPM, Brij[®] 96, sorbitol 70% y agua

Con el propósito de intentar favorecer la incorporación de un mayor porcentaje de fase interna (15%) en las microemulsiones o/a constituidas por IPM/Brij[®] 96/agua y, además incrementar la cantidad de nifedipino incorporada en los mismos, se plantea la posibilidad de introducir un cotensioactivo. Sin embargo, es necesario la utilización de cotensioactivos que sean farmacéuticamente aceptables y permitan la formación de microemulsiones biocompatibles que puedan ser administradas a través de la piel. Por ello, la siguiente aproximación para la optimización del desarrollo de las microemulsiones

o/a de nifedipino consiste en el desarrollo de sistemas dispersos constituidos por IPM, Brij® 96, sorbitol 70% no cristizable y agua.

5.1.5.1.- Componentes de las microemulsiones primarias o/a

A- Fase Oleosa:

Constituye la fase interna de nuestros sistemas dispersos, y como componente se selecciona el miristato de isopropilo (IPM), descrito de forma detallada en el apartado 5.1.1. de esta memoria.

B - Fase Acuosa:

Constituye la fase externa de las microemulsiones primarias, se utiliza agua bidestilada desionizada ultrapura, obtenida mediante un equipo de filtración Millipore Milli-Q Plus. De este modo, se evita la ausencia de posibles iones catalizadores de reacciones de degradación no deseables para la estabilidad del sistema disperso.

C - Tensioactivo:

Como tensioactivo se selecciona el Brij® 96 por su capacidad de originar una gran área de formación de microemulsiones (apartado 5.1.4.2). Se encuentra descrito ampliamente en el apartado 5.1.4.1.

D - Cotensioactivo:

El cotensioactivo empleado para favorecer la incorporación de fase interna y, por lo tanto, de nifedipino es una solución acuosa al 70% de sorbitol no cristizable.

El sorbitol al 70% no cristizable es una solución acuosa de almidón hidrogenado y parcialmente hidrolizado. Se trata de un líquido viscoso claro, incoloro e inodoro. Si consideramos las demás propiedades físicas, la solución acuosa al 70% de sorbitol presenta un valor de viscosidad dinámica de 110 mPa·s y una densidad (25°C) de 1,293 g·cm³, presentando un valor de índice de refracción de 1,458.

Las soluciones de sorbitol, son resistentes a la fermentación de numerosos microorganismos, sin embargo, se recomienda la incorporación de un conservante. La adición de polietilenglicoles líquidos a la solución de sorbitol, previa agitación vigorosa, da lugar a un gel soluble en agua, de aspecto similar a la cera, con un punto de fusión de 35-40°C. Las soluciones de sorbitol pueden reaccionar con óxido de hierro hasta decolorarlo. Se pueden almacenar en recipientes de plástico, cristal, aluminio o acero inoxidable.

Desde el punto de vista de su seguridad, el sorbitol se considera no tóxico y no carcinogénico, se emplea en numerosas formas farmacéuticas. Se utiliza como vehículo en formulaciones azucaradas y como estabilizante de fármacos, vitaminas y

suspensiones antiácidas. También, se utiliza para prevenir la cristalización de formulaciones acuosas.

El sorbitol se ha empleado en el desarrollo de microemulsiones o/a, como cotensioactivo, por tratarse de una molécula de pequeño tamaño y bajo peso molecular, lo que le permite incorporarse en la interfaz aceite/agua (Ktistis, 1990). Se encuentra recogido en la farmacopea americana (USP).

5.1.5.2- Diseño de microemulsiones primarias o/a

Para determinar la composición de las microemulsiones, se construyen los diagramas de fases pseudo-ternarios con los componentes de la formulación y se delimitan las áreas de formación correspondientes a estos sistemas dispersos

- Método:

Para la construcción de los diagramas se valoran volumétricamente, con la fase externa y a 25° C, mezclas de IPM, Brij® 96 y sorbitol 70% no cristizable.

El tensioactivo y cotensioactivo se encuentran en proporciones definidas dentro del intervalo comprendido entre 1,33/1 y 2,66/1 (p/p), con el fin de poder representar las regiones de formación de microemulsiones como áreas en el interior de un triángulo equilátero, en lugar de regiones volumétricas en el interior de un tetraedro, como correspondería a sistemas de cuatro componentes.

Así, en el vértice superior del triángulo se sitúan el tensioactivo y el cotensioactivo indicándose entre paréntesis la proporción correspondiente de ambos para cada diagrama de fases. Los sistemas que presentan transparencia e isotropía óptica, al ser observados a través de prismas de Nicols, se consideran como microemulsiones, pudiéndose delimitar las regiones de los distintos diagramas correspondientes a las áreas de formación de dichos sistemas dispersos.

Se realizan los siguientes ensayos de tipo cualitativo para determinar el signo de la microemulsión, al igual que se hizo en el apartado 5.1.3.2: 1) ensayo de dilución y 2) ensayo de solubilidad de un colorante en la fase continua.

- Resultados y comentarios:

Los diagramas de fases pseudo-ternarios y las áreas de formación de microemulsiones constituidas por IPM/ Brij® 96/ sorbitol 70% no cristizable /agua aparecen representados en las figuras 33 a 37.

La primera conclusión a tener en cuenta, según los resultados obtenidos, es que la presencia de una solución acuosa no cristizable al 70% en la formulación permite incorporar una mayor cantidad de fase interna a los sistemas dispersos. La explicación de este fenómeno reside en la acción cotensioactiva de este compuesto, que facilita la

curvatura de la película interfacial mediante una reducción de la tensión interfacial del sistema disperso.

En segundo lugar se observa que la proporción tensioactivo/cotensioactivo 2:1 ejerce el mayor efecto sobre el tamaño del área de formación de las microemulsiones. Sin embargo, dicha proporción no muestra una influencia significativa en la zona del diagrama donde se forman dichas áreas.

Como se puede observar, se produce un incremento del área de formación de microemulsiones a medida que aumenta la proporción de tensioactivo/cotensioactivo hasta 2:1; mientras que, se produce una disminución en la área de formación de las microemulsiones a medida que aumenta la proporción de tensioactivo/cotensioactivo por encima de esta relación.

Los ensayos de dilución y solubilización del colorante indican que son microemulsiones o/a.

Sin embargo, el desarrollo galénico de las microemulsiones constituidas por IPM/Brij® 96/sorbitol 70%/agua con distintos porcentajes tensioactivos/cotensioactivos presenta como principal inconveniente su estabilidad, ya que se mantienen únicamente estables durante menos de un mes.

La inestabilidad de estos sistemas dispersos se puede deber a la naturaleza acuosa del cotensioactivo que: 1) diluye la concentración de tensioactivo disminuyendo su capacidad como tal y 2) tiende a localizarse en la región entre la fase acuosa y la interfaz, una vez que el sistema se estabiliza con el tiempo, disminuyendo la flexibilidad de la interfaz.

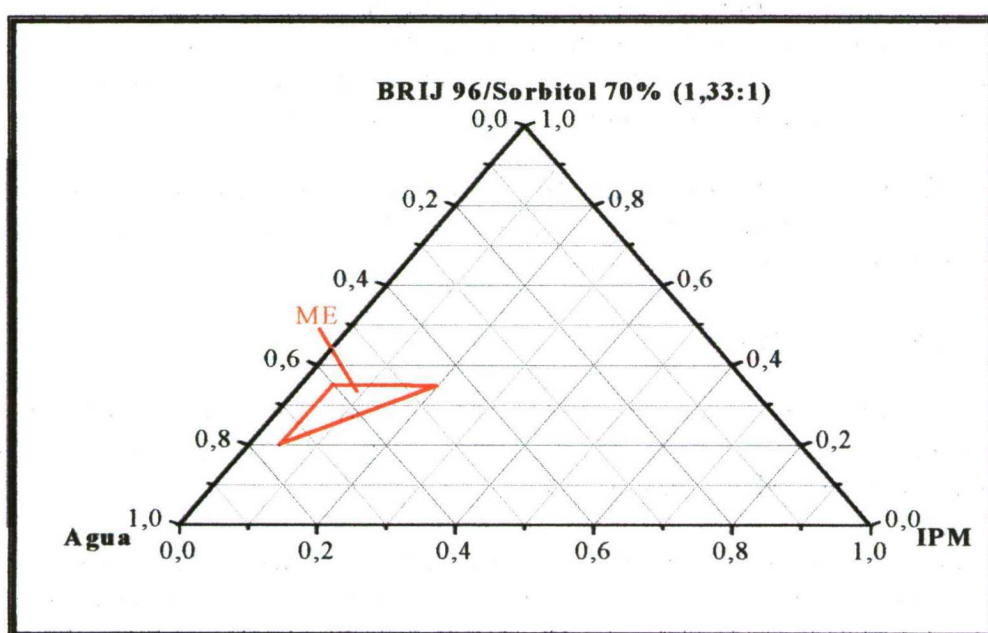


Figura 33. Diagrama de fases pseudo-ternario y área de formación de microemulsiones para sistemas IPM/Brij® 96/ sorbitol 70% no cristalizables /agua con una proporción tensioactivo/cotensioactivo de 1,33:1 (p/p).

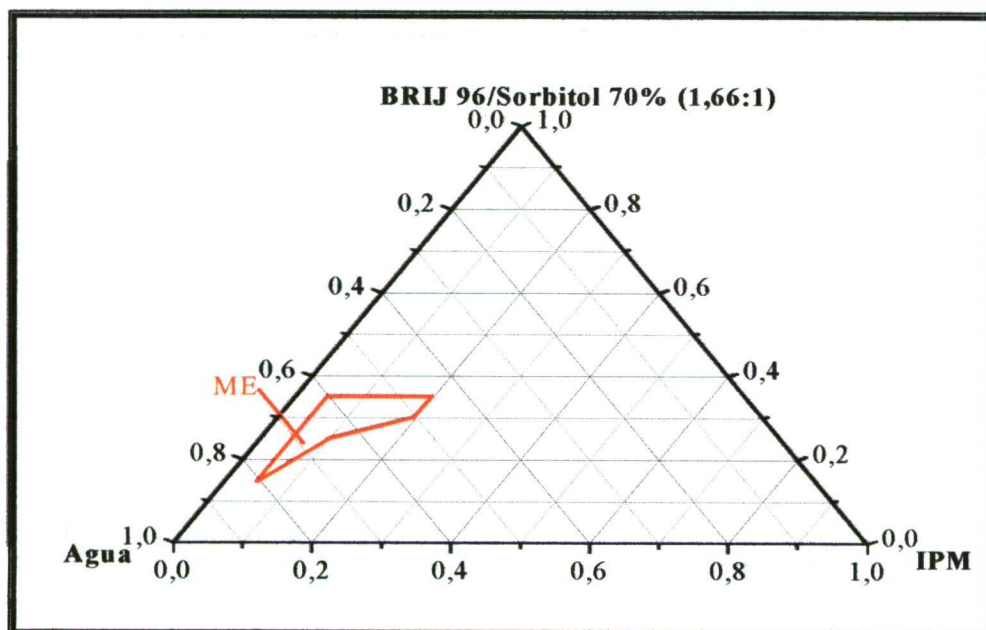


Figura 34. Diagrama de fases pseudo-ternario y área de formación de microemulsiones para sistemas IPM/Brij® 96/ sorbitol 70% no cristalizable/agua con una proporción tensioactivo/cotensioactivo de 1,66:1 (p/p).

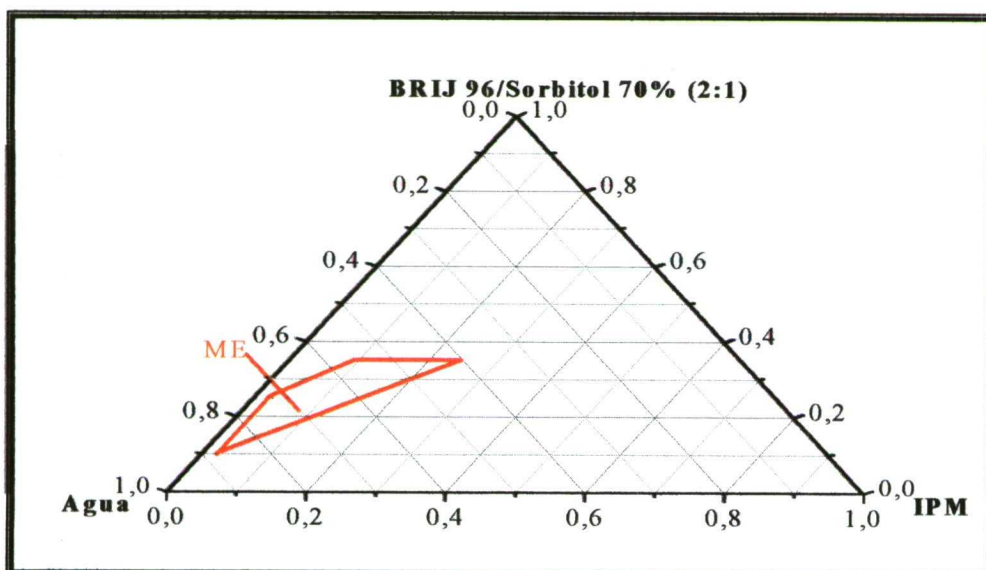


Figura 35. Diagrama de fases pseudo-ternario y área de formación de microemulsiones para sistemas IPM/Brij® 96/ sorbitol 70% no cristalizable/agua con una proporción tensioactivo/cotensioactivo de 2:1 (p/p).

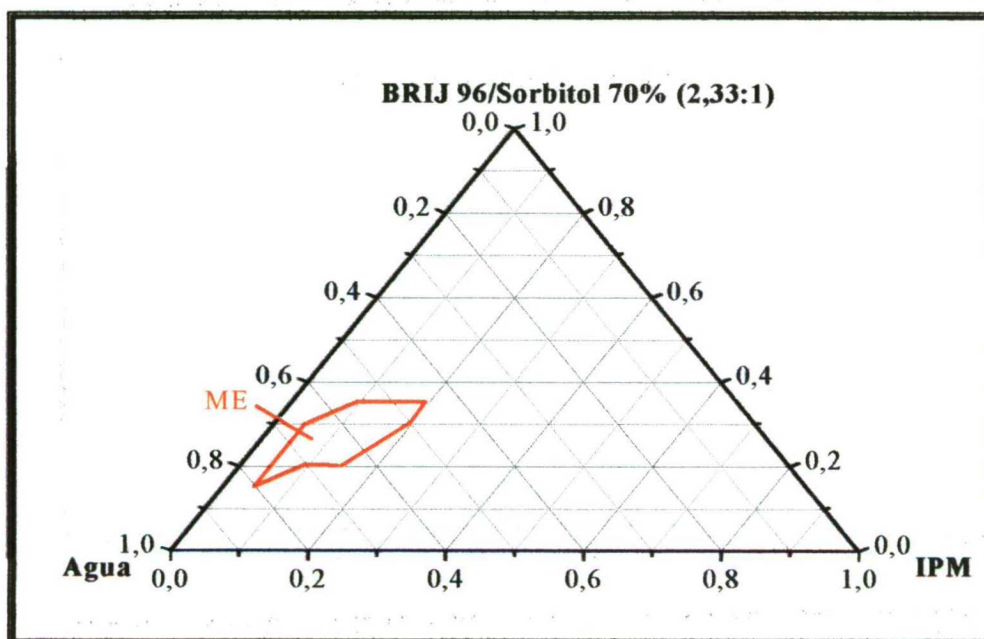


Figura 36. Diagrama de fases pseudo-ternario y área de formación de microemulsiones para sistemas IPM/Brij® 96/ sorbitol 70% no cristizable/agua con una proporción tensioactivo/cotensioactivo de 2,33:1 (p/p).

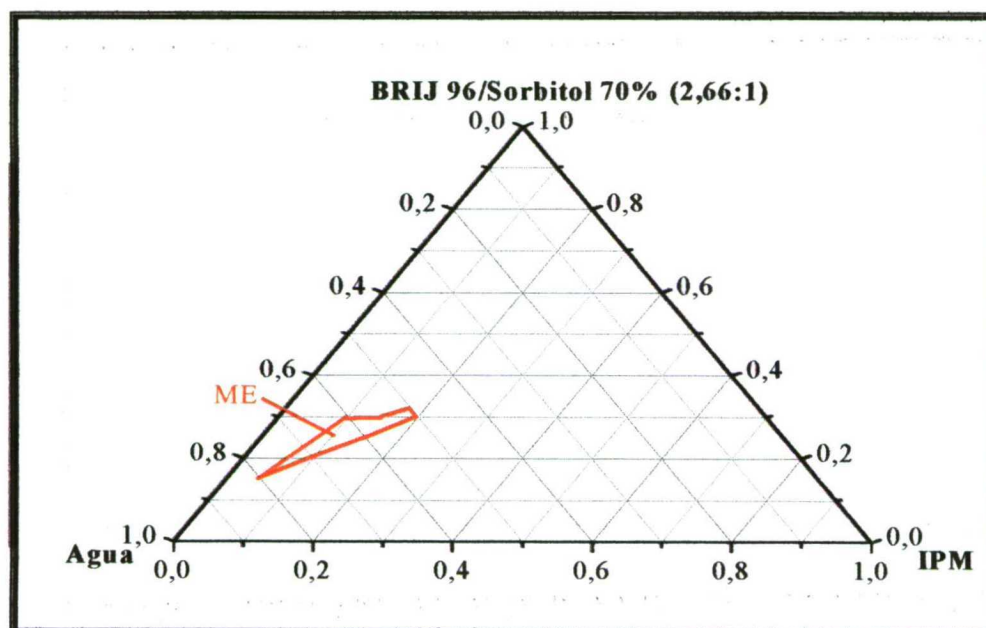


Figura 37. Diagrama de fases pseudo-ternario y área de formación de microemulsiones para sistemas IPM/Brij® 96/sorbitol 70% no cristizable/agua con una proporción tensioactivo/cotensioactivo de 2,66:1 (p/p).

5.1.6.- Microemulsiones primarias constituidas por IPM, Brij® 96, polietilenglicol 400 y agua

El siguiente intento, para la elección de un cotensioactivo que permita incorporar mayor cantidad de fase interna que en los sistemas constituidos por IPM/ Brij® 96/agua, con el fin de solubilizar la mayor cantidad de nifedipino y que además, sea capaz de formar sistemas que sean estables con el tiempo, es la incorporación de polietilenglicol 400 (PEG 400).

5.1.6.1- Componentes de la microemulsión primaria o/a

A- Fase Oleosa:

Constituye la fase interna de nuestros sistemas dispersos, y como componente se selecciona el miristato de isopropilo (IPM), descrito de forma detallada en el apartado 5.1.1. de esta memoria.

B - Fase Acuosa:

Constituye la fase externa de las microemulsiones primarias, y se utiliza agua bidestilada desionizada ultrapura, obtenida mediante un equipo de filtración Millipore Milli-Q Plus. De este modo se evita la ausencia de posibles iones catalizadores de reacciones de degradación no deseables para la estabilidad del sistema disperso.

C - Tensioactivo:

Como tensioactivo se selecciona el Brij® 96 por su capacidad de originar una gran área de formación de microemulsiones (apartado 5.1.4.2). Se ha descrito ampliamente en el apartado 5.1.4.1.

D - Cotensioactivo:

El cotensioactivo empleado para favorecer la formación de los sistemas dispersos y la incorporación de nifedipino es el polietilenglicol 400 (PEG 400). El PEG 400 es descrito por la USP como un compuesto constituido por la adición de polímeros de óxido de etileno y agua. Se trata de un líquido transparente, viscoso e incoloro. Presenta un olor débil característico y un sabor amargo. Su peso molecular medio es de 380-420, y la fórmula empírica es $\text{OHCH}_2(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_m\text{CH}_2\text{OH}$ donde el valor de m es igual a 8,7. Su fórmula estructural es la siguiente:

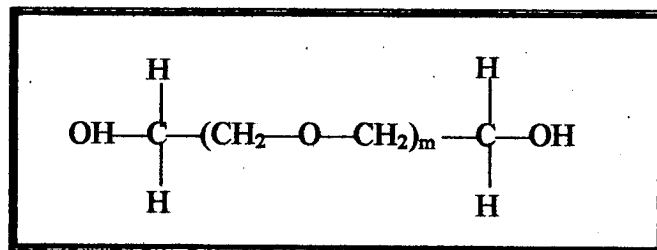


Figura 38. Fórmula estructural del PEG 400.

Desde el punto de vista de sus propiedades físico-químicas, se trata de una sustancia soluble en agua y miscible en todas las proporciones con otros polietilenglicoles. Es soluble en acetona, alcohol, benceno, glicerina y glicoles. Son poco solubles en hidrocarburos alifáticos y éter e insolubles en grasas, aceites sintéticos y minerales. La temperatura de congelación está comprendida entre 4 y 8 °C y el punto de inflamación es de 238°C. Los valores de viscosidad y densidad a 20°C son 90,0 centistokes y 1,127 g·ml⁻¹, respectivamente.

Con respecto a su estabilidad y almacenamiento podemos decir que, el PEG 400 es estable en contacto con el medio ambiente y también en solución, aunque sea higroscópico. No es un medio favorable para el crecimiento microbiano y no se enrancia. El PEG 400 y sus soluciones acuosas se pueden esterilizar por filtración, autoclave o irradiación gama. Se debe almacenar en contenedores bien cerrados de acero inoxidable, aluminio o cristal. Este compuesto se debe conservar en lugares fríos y ausentes de humedad.

El PEG 400 presenta numerosas aplicaciones farmacéuticas. Se emplea en una gran variedad de formulaciones farmacéuticas destinadas a la administración parenteral, tópica, oftálmica, oral y rectal. El PEG 400 es una sustancia no irritante para la piel y no se absorbe a través de ella. Es fácil de eliminar del lugar de aplicación debido a su solubilidad en agua. Las soluciones acuosas de PEG 400 se pueden emplear para ajustar la viscosidad y proporcionar consistencia. También, se utilizan como solventes para incrementar la solubilidad de fármacos poco solubles en agua y como cosolventes en la formulación de emulsiones y microemulsiones, localizados en la interfaz de los mismos.

5.1.6.2.- Diseño de microemulsiones primarias o/a

Para determinar la composición de las microemulsiones se construyen los diagramas de fases pseudo-ternarios con los componentes de la formulación y se delimita el área correspondiente a estos sistemas.

- Método:

Para la construcción de los diagramas se valoran, volumétricamente con la fase externa y a 25° C, mezclas de IPM, Brij® 96 y PEG 400. Estos dos últimos componentes se encuentran en proporciones definidas, dentro del intervalo comprendido entre 1:1 hasta 4:1 (Brij® 96/PEG 400, p/p). Así, en el vértice superior del triángulo se sitúan el tensioactivo y el cotensioactivo, indicándose entre paréntesis la proporción correspondiente de ambos para cada diagrama de fases.

Aquellos sistemas que presentan transparencia e isotropía óptica, al observar su comportamiento mediante luz polarizada a través de prismas de Nicols, se consideran como microemulsiones. De esta manera, se pudo delimitar las regiones de los distintos diagramas correspondientes a las áreas de formación de dichos sistemas dispersos.

Se realizan los siguientes ensayos de tipo cualitativo para determinar el tipo de la microemulsión, al igual que se hizo en el apartado 5.1.3.2:

- 1) ensayo de dilución
- 2) ensayo de solubilidad de un colorante en la fase continua.

- Resultados y comentarios:

Los diagramas de fases pseudo-ternario y las áreas de formación de las microemulsiones constituidas por IPM/Brij® 96/PEG 400/agua se representan en las figuras 39 a 42.

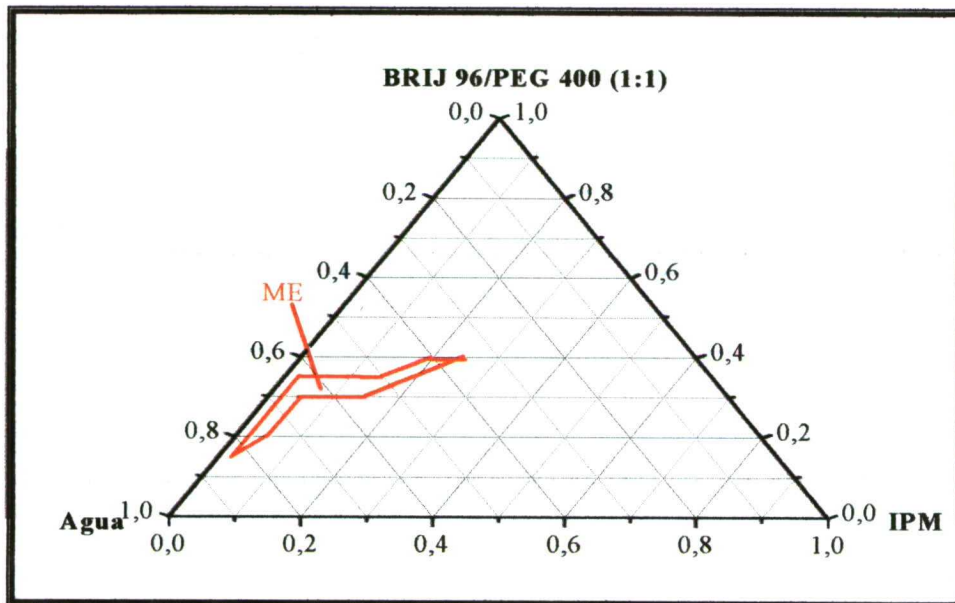


Figura 39. Diagrama de fases pseudo-ternario y área de formación de microemulsiones para sistemas IPM/Brij® 96/PEG 400/ agua con una proporción Brij® 96/ PEG 400 de 1:1 (p/p).

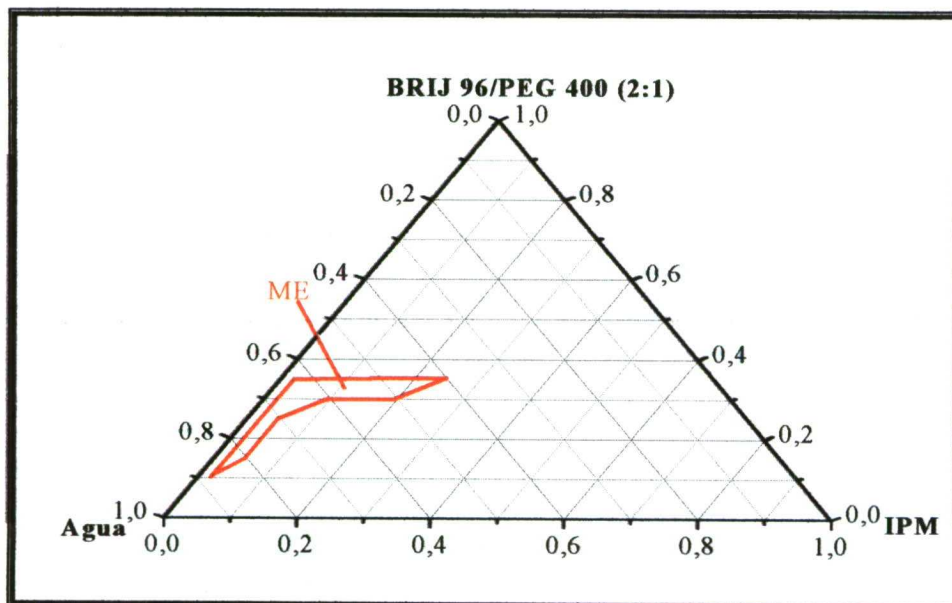


Figura 40. Diagrama de fases pseudo-ternario y área de formación de microemulsiones para sistemas IPM/Brij® 96/PEG 400/ agua con una proporción Brij® 96/ PEG 400 de 2:1 (p/p).

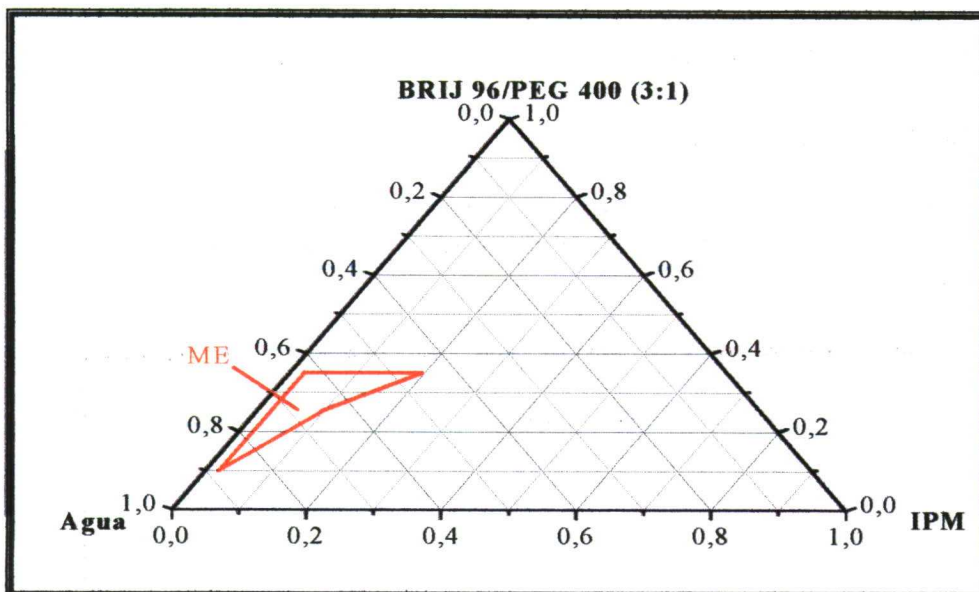


Figura 41. Diagrama de fases pseudo-ternario y área de formación de microemulsiones para sistemas IPM/Brij® 96/PEG 400/ agua con una proporción Brij® 96/ PEG 400 de 3:1 (p/p).

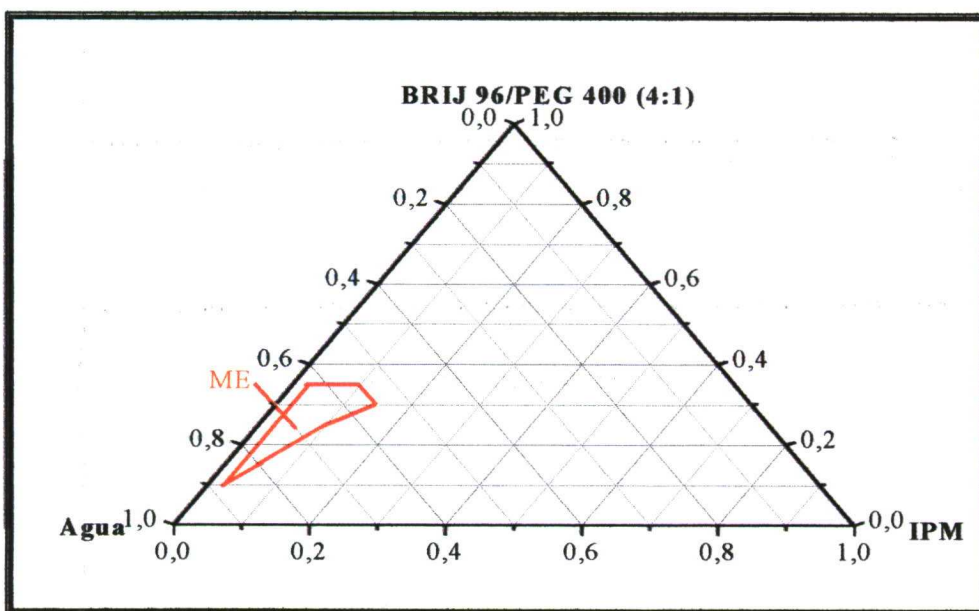


Figura 42. Diagrama de fases pseudo-ternario y área de formación de microemulsiones para sistemas IPM/Brij® 96/PEG 400/ agua con una proporción Brij® 96/ PEG 400 de 4:1 (p/p).

Los resultados obtenidos muestran la gran influencia ejercida por las distintas proporciones Brij® 96/PEG 400 sobre el tamaño del área de formación de las microemulsiones y la cantidad de fase interna que se puede incorporar al sistema disperso. Así, el diagrama correspondiente a sistemas dispersos con una proporción Brij® 96/PEG 400 de 3:1 (p/p) presenta la mayor área de formación de microemulsiones, pudiéndose incorporar hasta un 20% en peso de fase interna con un porcentaje

tensioactivo/cotensioactivo del 35%. Sin embargo, en los diagramas constituidos por microemulsiones con una proporción Brij® 96/PEG 400 de 1:1 y 2:1 (p/p) se logran incorporar los mayores contenidos en fase interna, concretamente un 25% en peso, con un porcentaje tensioactivo/cotensioactivo del 35% en peso. Para las diferentes proporciones Brij® 96/PEG 400 estudiadas, la mínima cantidad de IPM es de un 2,5% en peso con un porcentaje tensioactivo/cotensioactivo del 10% en peso.

Todas las microemulsiones formadas son estables a 25°C durante el mes a las que se someten a observación para comprobar la estabilidad de las mismas. Los ensayos de dilución y solubilización del colorante acuoso (naranja de metilo) en la fase acuosa indican que las microemulsiones formadas son de tipo o/a.

Entre las proporciones estudiadas, la proporción Brij® 96/PEG 400 3:1 (p/p) resulta de gran interés desde el punto de vista farmacéutico y galénico. Esta proporción permite incorporar el mayor porcentaje de fase interna en una microemulsión o/a (15%), localizada en el interior del área de formación de microemulsiones, con el mínimo contenido requerido de tensioactivos (30%). La elección de un porcentaje de fase interna para constituir una microemulsión que no se encuentre en los límites del área de formación de la microemulsión es de vital importancia, ya que la posterior incorporación del nifedipino desestabilizaría completamente el sistema disperso.

A partir de estos resultados podemos concluir que, la incorporación de PEG 400 como cotensioactivo, sólo permite incorporar un 2,5% más de fase interna que las microemulsiones constituidas por IPM/ Brij® 96/ agua. La posible explicación a este hecho podría ser debido a que la longitud del cotensioactivo empleado no es capaz de reducir la energía interfacial libre y la tensión interfacial (a valores próximos a cero) al incorporarse en la interfaz del sistema. Por lo tanto, no se puede conseguir, mediante el empleo de este cotensioactivo, ajustar a valores óptimos la curvatura interfacial y la elasticidad a las cuales se minimizan el estrés de la curvatura interfacial y las fuerzas de interacción de la interfaz.

5.1.6.3.- Determinación de la temperatura de inversión de fases en microemulsiones primarias o/a.

- Método:

Con el fin de conocer si el IPM es capaz de penetrar en la interfaz Brij® 96/PEG 400 (3:1, p/p) de los sistemas dispersos desarrollados en este apartado, se determina su temperatura de inversión de fases (PIT) comparándola con la temperatura a la cual se produce el punto de turbidez (CP) de las soluciones micelares (Brij® 96/PEG 400/agua). La determinación de ambos parámetros se realiza de manera similar a la descrita en el apartado 5.1.4.3. Los resultados finales obtenidos son la media de tres determinaciones de la temperatura de turbidez observada para cada sistema.

- Resultados y comentarios:

La tabla 23 muestra las temperaturas de inversión de fases y el punto de turbidez

de las microemulsiones o/a y micelas en función del porcentaje de IPM y Brij® 96/PEG 400.

IPM(%)	PIT (°C) a diferentes porcentajes de Brij® 96/PEG 400 3/1 (p/p)			
	15	20	25	30
<i>Micelas</i>	59,0±0,11	62,2±0,19	65,4±0,33	68,3±0,25
1	38,9±0,14	40,0±0,16	41,7±0,26	42,3±0,12
2	34,2±0,11	34,4±0,05	32,5±0,19	31,6±0,17
3	29,7±0,04	32,9±0,16	31,9±0,14	30,3±0,14
5	35,8±0,10	37,7±0,14	36,3±0,07	35,1±0,08

Tabla 23. Punto de turbidez y temperatura de inversión de fases de soluciones micelares (Brij® 96/PEG 400 /agua) y microemulsiones o/a (IPM/ Brij® 96/PEG 400 /agua) conteniendo distintos porcentajes (p/p) de IPM y Brij® 9/PEG 400.

Al igual que ocurre con las microemulsiones constituidas por IPM/Brij® 96/agua (apartado 5.1.4.3), se produce una disminución del PIT en todas las microemulsiones estudiadas con distintos porcentajes de tensioactivo/cotensioactivo a medida que se aumenta el contenido en fase interna desde el 1-3%. Después, se produce un aumento del PIT al incrementar el contenido en fase interna hasta el 5%.

La incorporación de un 5% de fase interna da lugar a un aumento del PIT para los sistemas dispersos estudiados con distintos porcentajes Brij® 96/ PEG 400 con una relación 3:1(p/p). Se deduce que se produce una disminución en la incorporación del aceite en la monocapa tensioactivo/cotensioactivo dando lugar a la formación de más gotículas esféricas de fase interna y por lo tanto de un núcleo central de IPM, el cual constituirá una zona de solubilización de nuestro principio activo.

Si comparamos estos resultados con los obtenidos para las microemulsiones IPM/Brij® 96/agua se observa que estas últimas presentan mayores valores de PIT tanto para la mayoría de las soluciones micelares como para las microemulsiones a todos los porcentajes de Brij® 96 y Brij® 96/PEG 400 estudiados. Este fenómeno indica que la incorporación de PEG 400 facilita la incorporación del IPM en la interfaz tensioactivo/cotensioactivo y la formación de agregados.

5.1.6.4.- Solubilización de nifedipino en soluciones micelares Brij® 96/PEG 400/agua y microemulsiones IPM/ Brij® 96/PEG 400/agua

Este estudio se realiza para demostrar la capacidad de las microemulsiones o/a, constituidas con IPM/ Brij® 96/PEG 400/agua, de solubilizar e incorporar mayor cantidad de nifedipino que una solución micelar de igual composición (solución acuosa de tensioactivo sin aceite). Así, si el aceite empleado es capaz de solubilizar el nifedipino en cantidad suficiente y además formar un núcleo lipófilo en el interior de la microgotas, en cuya interfaz se localiza el tensioactivo y el cotensioactivo, se puede esperar un aumento en la solubilización del fármaco en el interior de la microemulsión. La incorporación de nifedipino en las microemulsiones será mucho mayor que en las

soluciones micelares debido a la formación de una zona adicional para la solubilización del nifedipino.

- Método:

Para realizar este estudio se preparan microemulsiones o/a constituidas por un 5% de IPM y un 15, 20 y 25% de Brij® 96/PEG 400, que forman parte del área de formación de la microemulsiones anteriormente determinadas. Las soluciones micelares están constituidas por soluciones acuosas de tensioactivo/cotensioactivo al 15, 20 y 25%. La cantidad de nifedipino incorporado se determina por triplicado mediante la adicción de una cantidad conocida de nifedipino (50 mg) a las distintas soluciones micelares y microemulsiones preparadas. Todas las muestras se mantienen como soluciones transparentes en equilibrio con un exceso de fármaco durante todo el ensayo.

Las muestras se protegen de la luz y se introducen en un baño de agitación Techne SB-16 con una velocidad constante de 20 r.p.m y a una temperatura de $25 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$. Después de ocho días, se separa el exceso de fármaco de todas las muestras mediante filtración a través de filtros de acetato de celulosa, siendo su tamaño de poro de $0,22 \mu\text{m}$. Todas las preparaciones se valoran, por triplicado ($n=3$), con respecto a su contenido en nifedipino por HPLC después de diluirlas apropiadamente con metanol.

- Resultados y comentarios:

Las cantidades incorporadas (% p/v) de nifedipino en las soluciones micelares y en las microemulsiones se muestran en la tabla 24.

<i>Aceite</i>	<i>%(p/v) de nifedipino incorporado \pm D.E a distintos % (p/p) Brij® 96/PEG 400 en microemulsiones</i>		
	<i>15%</i>	<i>20%</i>	<i>25%</i>
<i>Micelas</i>	0,334 \pm 0,009	0,358 \pm 0,015	0,391 \pm 0,019
<i>IPM</i>	0,383 \pm 0,011	0,410 \pm 0,017	0,463 \pm 0,018

Tabla 24. Incorporación de nifedipino en soluciones micelares (Brij® 96/PEG 400/agua) y microemulsiones (IPM/ Brij® 96/PEG 400/agua) con un 5 % p/p de IPM a 25°C .

La cantidad incorporada de nifedipino en las microemulsiones es mayor que en las soluciones micelares y en ambos casos aumenta a mediada que lo hace el porcentaje de Brij® 96/PEG 400. Al realizar un ANOVA se observa que, para la misma concentración de tensioactivo/cotensioactivo ($P<0,05$), existen diferencias significativas en las cantidades solubilizadas de nifedipino entre las microemulsiones y las soluciones micelares. De acuerdo con el modelo aplicado (Patel y cols., 1981) en el apartado 5.1.4.4. para explicar las regiones de incorporación de nifedipino, el principal lugar de solubilización del nifedipino en los sistemas constituidos por Brij® 96 son las cadenas de polioxietileno deshidratadas del tensioactivo. Estas cadenas se encuentran localizadas en la zona más próxima al núcleo de la micela (región hidrocarbonada) y de la microemulsión (fase dispersa IPM/región hidrocarbonada). No obstante, la incorporación del PEG 400 como cotensioactivo, localizado en la interfaz aceite/agua, favorece la solubilización de nifedipino en esta región.

En la microemulsión existe otro lugar de solubilización del nifedipino, teniendo en cuenta la lipofilia del principio activo ($\log P_{oa} = 2,50$) y su solubilidad en IPM ($0,19 \pm 0,03$, % p/v), que es el núcleo de la fase dispersa de la microemulsión o/a. Con el porcentaje de IPM incorporado (5%) se origina un núcleo lipófilo al disminuir la penetración de IPM en la monocapa del tensioactivo, como se puede deducir del aumento del PIT para este porcentaje de aceite (*apartado 5.1.6.3.*), dando lugar a la formación de más gotículas esféricas de fase interna. Esto explica que las microemulsiones constituidas por IPM/Brij® 96/agua incrementan significativamente la solubilización de nifedipino con respecto a las soluciones micelares con concentración equivalente de tensioactivo/cotensioactivo, por dos motivos: 1) origina un lugar potencial para la solubilización del nifedipino (núcleo hidrofóbico) y 2) aumenta la concentración de las cadenas de polioxietilen del tensioactivo (foco de solubilización del nifedipino) como consecuencia de la disminución en la penetración del IPM en la interfaz tensioactivo/cotensioactivo.

5.1.6.5.- Incorporación de nifedipino en la microemulsión primaria o/a

- Método:

Para la incorporación del principio activo se selecciona, dentro del área de formación en el diagrama de fases, la microemulsión con un contenido en IPM del 10%, en peso y un contenido total Brij® 96/PEG 400 del 30% en peso con una relación 3:1, ya que este sistema presenta la mayor proporción de fase dispersa con el mínimo requerimiento de tensioactivo/cotensioactivo necesario para su formación.

Para determinar la máxima cantidad de nifedipino incorporado al sistema disperso, se adicionan a las mezclas IPM/ Brij® 96/PEG 400 cantidades crecientes de principio activo correspondientes a unas concentraciones teóricas de 0,5; 1; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Una vez que el nifedipino se dispersa en las mezclas mencionadas se adiciona la fase acuosa, manteniendo el sistema en agitación hasta la formación de la microemulsión. A continuación, se filtran las microemulsiones obtenidas a través de filtros de celulosa de $0,45 \mu\text{m}$ de tamaño de poro para eliminar el nifedipino en suspensión y por lo tanto no incorporado al sistema. La cuantificación del principio activo presente en los distintos sistemas se realiza por HPLC, previa disolución de las microemulsiones obtenidas en metanol hasta obtener una concentración teórica de nifedipino en solución de $20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. El número de muestras estudiadas por concentración es de tres ($n = 21$), y los análisis de cada muestra se realizan por triplicado.

- Resultados y comentarios:

La figura 43 muestra los resultados realizados en los estudios obtenidos sobre la incorporación de nifedipino a la microemulsión.

Como se puede observar, la máxima cantidad de nifedipino que se puede incorporar al sistema disperso seleccionado es de $4,12 \pm 0,14 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Los sistemas constituidos por IPM/Brij® 96/PEG 400/agua permiten incorporar 4,3 veces más

nifedipino que las microemulsiones IPM/Brij® 96/agua.

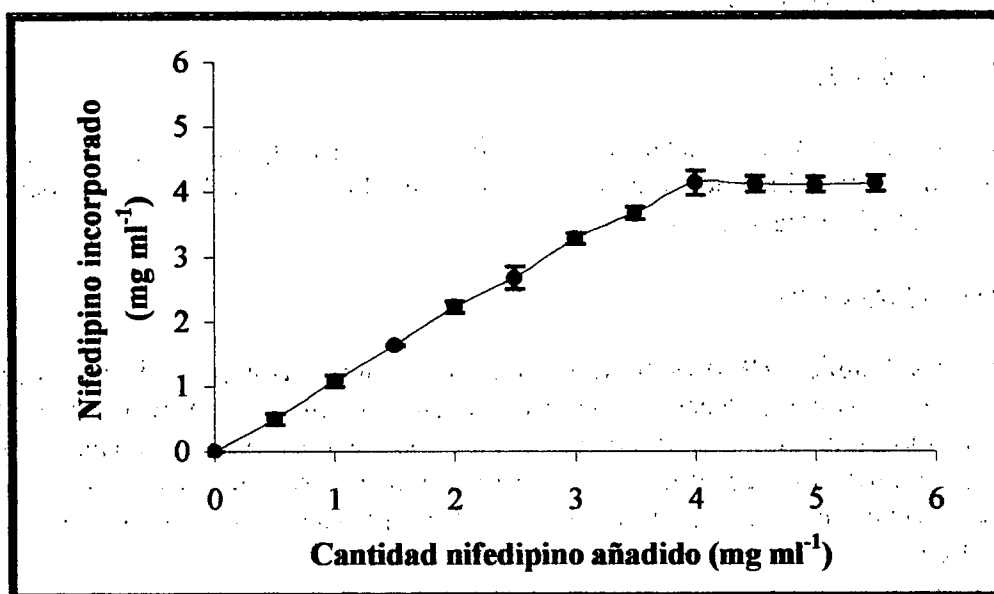


Figura 43. Cantidad de nifedipino incorporado a la microemulsión IPM/Brij® 96/PEG 400/agua; 10/30/60 (p/p/p).

5.1.7.- Microemulsiones primarias constituidas por IPM/Brij® 96/propilenglicol/agua

Como consecuencia de los inconvenientes que presenta la utilización del PEG 400 como cotensioactivo, debido a que la longitud de su cadena dificulta la incorporación de mayores porcentajes de fase interna, se piensa en utilizar un cotensioactivo de cadena más corta. El cotensioactivo seleccionado debe ser biocompatible para que se pueda administrar por vía transdérmica y además, favorecer la obtención de microemulsiones estables a lo largo del tiempo. Por este motivo, la siguiente aproximación para la optimización del desarrollo de microemulsiones o/a de nifedipino consiste en la obtención de sistemas dispersos con fase interna oleosa y propilenglicol como cotensioactivo, dando lugar a microemulsiones constituidas por IPM/ Brij® 96/propilenglicol/agua.

5.1.7.1- Componentes de las microemulsiones primarias o/a

A- Fase Oleosa:

Constituye la fase interna de nuestros sistemas dispersos, y como componente se selecciona el miristato de isopropilo (IPM), descrito de forma detallada en el apartado 5.1.1. de esta memoria.

B - Fase Acuosa:

Constituye la fase externa de las microemulsiones primarias, se utiliza agua bidestilada desionizada ultrapura, obtenida mediante un equipo de filtración Millipore Milli-Q Plus. De este modo, evitamos la ausencia de posibles iones catalizadores de

reacciones de degradación no deseables para la estabilidad de los sistemas dispersos desarrollados en este apartado.

C - Tensioactivo:

Como tensioactivo se selecciona el Brij® 96 por su capacidad de originar una gran área de formación de microemulsiones (apartado 5.1.4.2). Se ha descrito ampliamente en el apartado 5.1.4.1.

D - Cotensioactivo:

El propilenglicol (PG) es el cotensioactivo empleado con el fin de favorecer la formación de los sistemas dispersos y la incorporación de un mayor porcentaje de IPM. Es un poli-hidroxi-alcohol claro, incoloro, viscoso, prácticamente inodoro, con un sabor entre dulce y agrio que recuerda a la de la glicerina. Presenta un peso molecular de 76,09, su fórmula empírica es $C_3H_8O_2$ y su fórmula estructural se muestra en la siguiente figura:

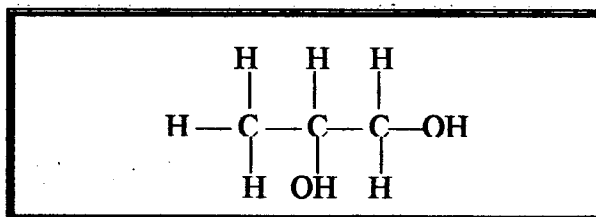


Figura 44. Fórmula estructural del propilenglicol.

Desde el punto de vista de sus propiedades fisico-químicas, se trata de una sustancia líquida soluble en éter (1/6, v/v), miscible con agua, etanol (95%), acetona, glicerina y cloroformo e insoluble en aceites minerales ligeros y de síntesis. Presenta temperaturas de fusión de -59°C y ebullición de 188°C . Los valores de viscosidad y densidad a 20°C son de 58,1 mPa y $1,038\text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectivamente. Con respecto a su estabilidad y almacenamiento, el propilenglicol es estable a bajas temperaturas en contenedores bien cerrados pero se descompone a temperaturas altas y expuesto al aire dando lugar a productos de oxidación. Así mismo, es higroscópico y se debe almacenar en envases al vacío, protegido de la luz y en lugares secos y frescos. El propilenglicol presenta numerosas aplicaciones farmacéuticas como solvente, cosolvente, estabilizante, humectante y conservante de formulaciones para administración tópica. En cobayas, por vía subcutánea, la Dosis Letal 50 (DL_{50}) es de 18,5-19,9 g/Kg.

5.1.7.2.- *Diseño de microemulsiones primarias o/a*.

Para determinar la composición de las microemulsiones, se construyen los diagramas de fases pseudo-ternarios con los componentes de la formulación y se delimita el área correspondiente a estos sistemas.

- Método:

Para la construcción de los diagramas se valoran, volumétricamente con la fase

externa y a 25° C, mezclas de IPM, Brij® 96 y propilenglicol, encontrándose estos dos últimos componentes en proporciones definidas dentro del intervalo comprendido entre 1:1 hasta 4:1 (p/p). Así, en el vértice superior del triángulo se sitúan el tensioactivo y el cotensioactivo, indicándose entre paréntesis la proporción correspondiente de ambos para cada diagrama de fases.

Aquellos sistemas que presentan transparencia e isotropía óptica, al observar su comportamiento mediante luz polarizada a través de prismas de Nicols, se consideran como microemulsiones, pudiéndose delimitar las regiones de los distintos diagramas de fases correspondientes a las áreas de formación de los sistemas dispersos estudiados.

Se realizan los siguientes ensayos de tipo cualitativo para determinar el signo de la microemulsión, al igual que se hizo en el apartado 5.1.3.2: 1) ensayo de dilución y 2) ensayo de solubilidad de un colorante (naranja de metilo) en la fase continua.

- Resultados y comentarios:

Los diagramas de fases pseudo-ternarios y las áreas de formación de las microemulsiones constituidas por IPM/Brij® 96/propilenglicol/agua se representan en las figuras 45-48.

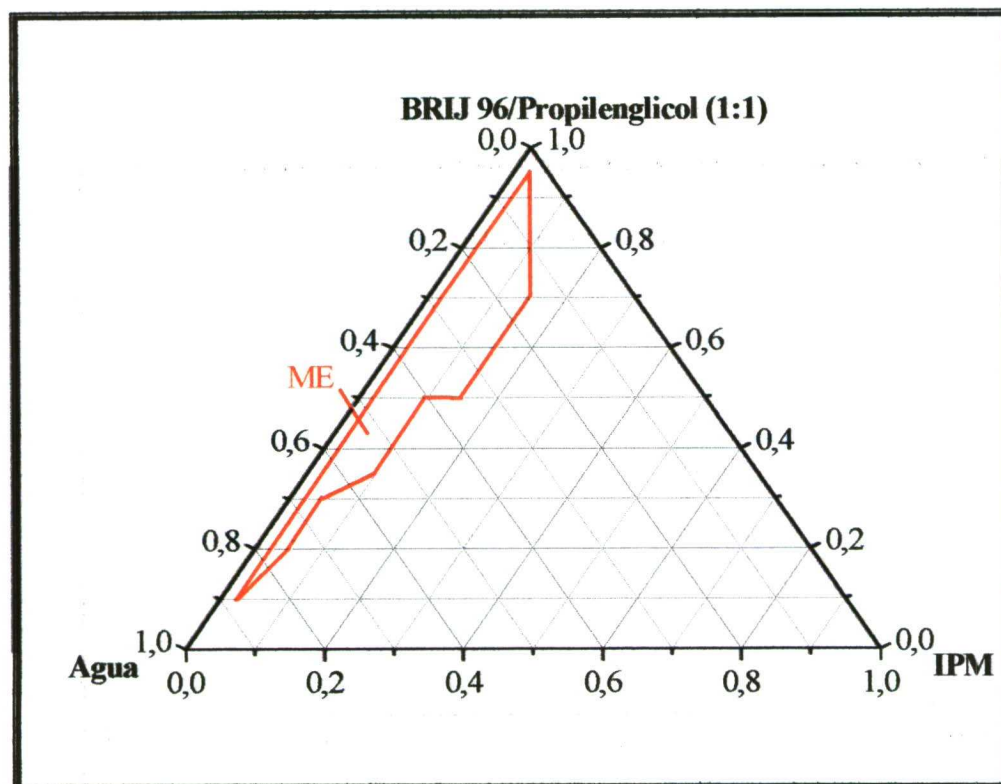


Figura 45. Diagrama de fases pseudo-ternario y área de formación de microemulsiones para sistemas IPM/Brij® 96/propilenglicol/agua con una proporción Brij® 96/propilenglicol de 1:1 (p/p).

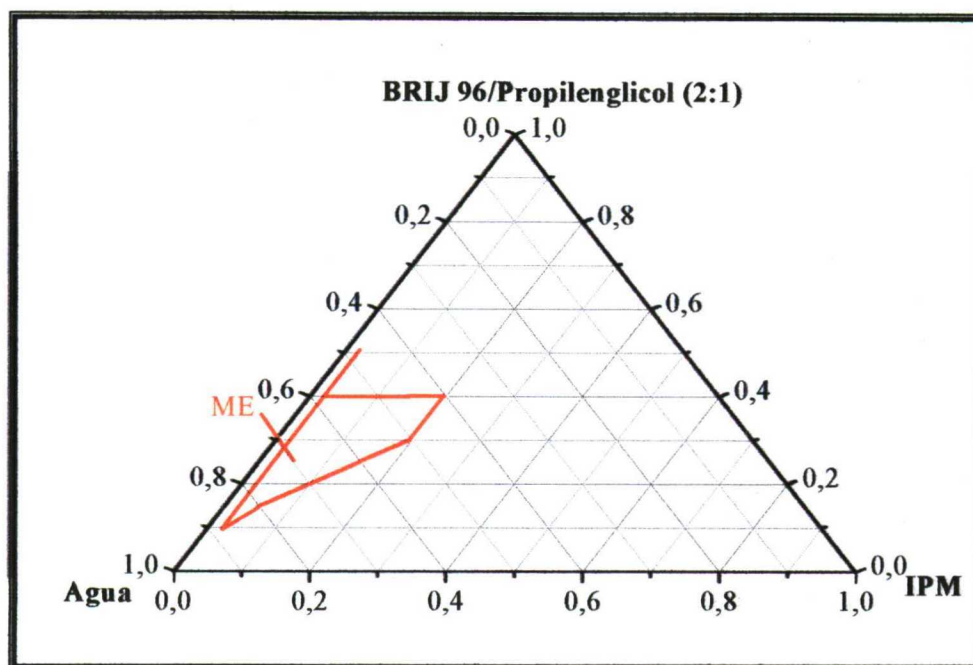


Figura 46. Diagrama de fases pseudo-ternario y área de formación de microemulsiones para sistemas IPM/Brij® 96/propilenglicol/agua con una proporción Brij® 96/propilenglicol de 2:1 (p/p).

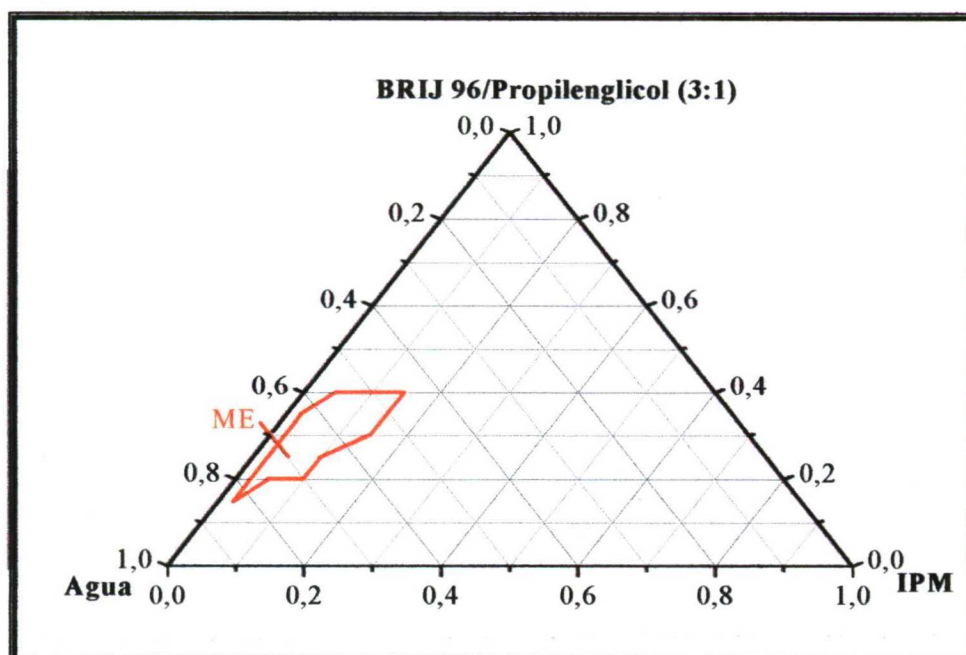


Figura 47. Diagrama de fases pseudo-ternario y área de formación de microemulsiones para sistemas IPM/Brij® 96/propilenglicol/agua con una proporción Brij® 96/propilenglicol de 3:1 (p/p).

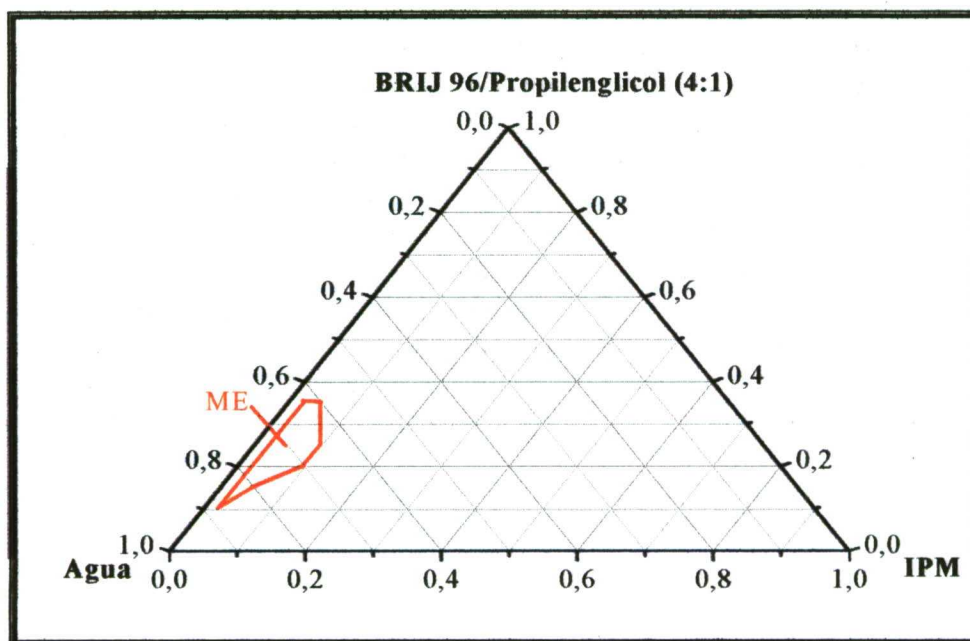


Figura 48. Diagrama de fases pseudo-ternario y área de formación de microemulsiones para sistemas IPM/Brij® 96/propilenglicol/agua con una proporción Brij® 96/ propilenglicol de 4:1 (p/p).

Los resultados obtenidos muestran la gran influencia ejercida por las distintas proporciones Brij® 96/propilenglicol sobre el tamaño del área de formación de las microemulsiones y la cantidad de fase interna que se puede incorporar en el sistema disperso. Así, los diagramas correspondientes a sistemas con proporciones Brij® 96/propilenglicol 1:1 y 2:1 (p/p) presentan las mayores áreas de formación de microemulsiones.

No obstante, el área de formación de las microemulsiones obtenida con la proporción Brij® 96/propilenglicol 1:1 se desplaza hacia regiones con mayor contenido en tensioactivo/cotensioactivo. En esta relación, el mayor contenido de fase interna incorporado (15%) requiere porcentajes de tensioactivo/cotensioactivo muy elevados (50-70%), lo que les convierte en sistemas dispersos no adecuados para la administración transdérmica debido al riesgo de irritación de estos compuestos. El máximo porcentaje de tensioactivo/cotensioactivo aceptable (30%) para la administración transdérmica de microemulsiones permite incorporar un 5% de fase interna.

Por otro lado, la proporción Brij® 96/propilenglicol 2:1 (p/p) permite incorporar el mayor contenido en fase interna (20%), con un contenido de tensioactivo/cotensioactivo adecuado (30%) para que este sistema disperso se pueda administrar a través de la piel. Para las proporciones Brij® 96/propilenglicol 3:1 y 4:1, las áreas de formación de microemulsiones son menores que para las proporciones mencionadas anteriormente, disminuyendo a medida que aumenta la proporción de Brij® 96/propilenglicol. Además, la cantidad de fase interna incorporada es menor, siendo de un 15% y un 7,5% con un contenido en tensioactivo/cotensioactivo del 30% para la proporción Brij® 96/propilenglicol 3:1 y 4:1, respectivamente. En función de los resultados obtenidos, se concluye que el propilenglicol contribuye de manera muy importante y eficaz a la incorporación de fase oleosa a las microemulsiones objeto de estudio y a la formación

de las mismas. La presencia de porcentajes elevados de cotensioactivo permite la obtención de microemulsiones en una región más amplia en el diagrama de fases, al mismo tiempo que favorecen la incorporación de IPM con un requerimiento de tensioactivo/cotensioactivo mucho menor que en los sistemas que se han estudiado hasta el momento. La explicación a este hecho puede deberse a que el propilenglicol es un cotensioactivo de cadena corta, favoreciéndose su incorporación en la interfaz del sistema disperso. De esta manera, reduce la energía libre y la tensión interfacial dando lugar a las curvaturas requeridas para la formación de microemulsiones con un contenido mayor de fase interna. Todas las microemulsiones formadas son estables a 25°C durante el mes a las que se someten a observación para comprobar la estabilidad de las mismas. Los ensayos de dilución de la fase externa con agua y solubilización del colorante acuoso (naranja de metilo) en la fase acuosa indican que las microemulsiones formadas son de tipo o/a.

5.1.7.3.- Determinación de la temperatura de inversión de fases en microemulsiones o/a

Con el fin de conocer si el IPM es capaz de penetrar en la interfaz Brij® 96/propilenglicol (2:1, p/p) de los sistemas dispersos desarrollados en este apartado, se determina su temperatura de inversión de fases (PIT) y se compara con la temperatura a la que se produce el punto de turbidez (CP) de las soluciones micelares (Brij® 96/propilenglicol/ agua). La determinación de ambos parámetros se realiza de forma similar a la descrita en el apartado 5.1.4.3. Los resultados finales obtenidos son la media de tres determinaciones de la temperatura de turbidez observada para cada sistema.

- Resultados y comentarios:

Al igual que ocurre en las microemulsiones constituidas por IPM/Brij® 96/agua y IPM7Brij® 96/PEG 400/agua se produce una disminución del PIT en todas las microemulsiones estudiadas, con distintos porcentajes de tensioactivo/cotensioactivo, a medida que se aumenta el contenido en fase interna, desde el 1-3%, para luego producirse un aumento del PIT al incrementar el contenido en fase interna hasta el 5% (Tabla 25).

Concentración de IPM (%)	PIT (°C) a diferentes porcentajes de Brij® 96/PG 3/1 (p/p)			
	15	20	25	30
Micelas	64,3±0,17	68,1±0,31	74,6±0,27	80,4±0,22
1	49,5±0,28	56,1±0,07	64,6±0,42	74,7±0,27
2	42,7±0,35	44,2±0,25	46,8±0,07	51,3±0,34
3	42,0±0,07	41,8±0,09	43,5±0,49	44,3±0,14
5	45,6±0,09	44,9±0,09	46,7±0,49	48,1±0,14

Tabla 25. Punto de turbidez y temperatura de inversión de fases de soluciones micelares (Brij® 96/propilenglicol /agua) y microemulsiones o/a (IPM/ Brij® 96/propilenglicol/agua) conteniendo distintos porcentajes (p/p) de IPM y Brij® 96.

Como ya se ha explicado detalladamente en el apartado 5.1.4.3, el volumen molecular del IPM (530 Å) es el responsable de la disminución del PIT en los sistemas dispersos estudiados, debido a que es capaz de penetrar en la interfaz de la monocapa de tensioactivo y favorecer la formación de agregados asimétricos produciendo una disminución del PIT por debajo del de la micela (Malcolson y cols., 1998). Este fenómeno se manifiesta de forma más intensa con un 3% de fase interna, favoreciendo de forma más acusada la formación de agregados, como se puede observar por los valores de PIT más bajos obtenidos en este estudio. Además, la penetración del IPM en la interfaz tensioactivo/cotensioactivo origina un fenómeno de dilución de la concentración de las cadenas de polioxietileno que se traduce en una disminución de la cantidad de nifedipino incorporado.

La incorporación de un 5% de fase interna produce un aumento de los valores del PIT para los sistemas dispersos estudiados con distintos porcentajes Brij® 96/PG a una relación 3/1 (p/p). De este hecho se puede deducir que el aceite deja de penetrar en la monocapa de tensioactivo, lo que daría lugar a la formación de más gotículas esféricas de fase interna y por lo tanto de un núcleo central de IPM el cual constituirá una zona de solubilización del principio activo.

Si se comparan los resultados obtenidos en la tabla 25 para los sistemas Brij® 96/propilenglicol con los de los sistemas constituidos por Brij® 96 y Brij® 96 /PEG 400, se observa claramente que en estos dos últimos casos los valores de PIT son mucho menores tanto para las soluciones micelares como para las microemulsiones, a todos los porcentajes estudiados. Por lo tanto, la incorporación de propilenglicol a dichos sistemas disminuye la formación de agregados. En el caso de las microemulsiones este efecto podría deberse a que la incorporación del propilenglicol en la interfaz del sistema, disminuye la tensión interfacial y de este modo incrementa la flexibilidad interfacial para favorecer la formación de las microemulsiones, dificultando la penetración del aceite en la monocapa de tensioactivo (Ho y cols, 1996).

5.1.7.4.- Solubilización de nifedipino en soluciones micelares Brij® 96/propilenglicol/agua y microemulsiones IPM/ Brij® 96/propilenglicol/agua

Este estudio se lleva a cabo para demostrar la capacidad de las microemulsiones o/a, constituidas con IPM/ Brij® 96/propilenglicol/agua, de solubilizar e incorporar el nifedipino en mayor cantidad que en una solución micelar de igual composición (solución acuosa de tensioactivo sin aceite). Así pues, si el aceite empleado es capaz de solubilizar el fármaco en cantidad suficiente y formar un núcleo lipófilo en el interior de la microgotas en cuya interfaz se localizaría el tensioactivo y el cotensioactivo, se podría esperar un aumento en la solubilización del fármaco en el interior de la microemulsión. La cantidad de nifedipino incorporado en la microemulsión o/a debería ser mayor que en la solución micelar debido a la formación de una zona adicional para la solubilización del fármaco.

- Método:

Para realizar dicho estudio se preparan microemulsiones o/a, constituidas por un

5% de IPM y un 20, 25 y 30% de Brij® 96/propilenglicol, que forman parte del área de formación de las microemulsiones anteriormente determinadas. Las soluciones micelares están constituidas por soluciones acuosas del tensioactivo/cotensioactivo al 20, 25 y 30%. El nivel de incorporación del nifedipino se determina mediante la adición de una cantidad conocida de nifedipino (50 mg) a las distintas soluciones micelares y microemulsiones preparadas por triplicado. Durante todo el ensayo todas las muestras estudiadas se mantienen como soluciones transparentes en equilibrio con un exceso de fármaco.

Todas las muestras se protegen de la luz y se introducen en un baño de agitación Techne SB-16, con una velocidad constante de 20 r.p.m. y a una temperatura de $25 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$. Después de ocho días, el exceso de fármaco se separa de todas las muestras mediante filtración, empleando filtros de acetato de celulosa con un tamaño de poro de $0,22 \mu\text{m}$.

Todas las preparaciones se valoran, por triplicado ($n=3$), con respecto a su contenido en nifedipino por HPLC después de diluirlas apropiadamente con metanol.

- Resultados y comentarios:

Las cantidades incorporadas (% p/v) de nifedipino en las soluciones micelares y en las microemulsiones se muestran en la tabla 26.

Aceite	% (p/v) de nifedipino incorporado \pm D.E a distintos % (p/p) Brij® 96/PG en microemulsiones		
	20%	25%	30%
Micelas	$0,252 \pm 0,010$	$0,332 \pm 0,011$	$0,383 \pm 0,012$
IPM	$0,299 \pm 0,009$	$0,381 \pm 0,014$	$0,450 \pm 0,017$

Tabla 26. Incorporación de nifedipino en soluciones micelares (Brij® 96/propilenglicol/agua) y microemulsiones (IPM/ Brij® 96/ propilenglicol/agua) con un 5 % p/p de IPM a 25°C .

La cantidad incorporada de nifedipino en las microemulsiones es mayor que en las soluciones micelares, y en ambos casos se incrementa a mediada que aumenta el porcentaje de Brij® 96/PG. Al realizar un ANOVA se observa que, para la misma concentración de tensioactivo/cotensioactivo ($P < 0,05$), existen diferencias significativas en las cantidades solubilizadas de nifedipino en las microemulsiones comparadas con las soluciones micelares.

De acuerdo con el modelo aplicado (Patel y cols., 1981) en el apartado 5.1.4.4, para explicar las principales regiones de incorporación de nuestro principio activo, se sabe que el principal lugar de solubilización del nifedipino en los sistemas constituidos por Brij® 96 son las cadenas de polioxietileno deshidratado del tensioactivo. Estas cadenas se encuentran localizadas en la zona más próxima al núcleo de la micela (región hidrocarbonada) y de la microemulsión (fase dispersa IPM/región hidrocarbonada). No obstante, la incorporación de propilenglicol como cotensioactivo, localizado en la interfaz aceite/agua, incrementará notablemente la solubilidad del nifedipino en esta región.

En la microemulsión existe otro lugar de solubilización del nifedipino, teniendo en cuenta la lipofilia del principio activo ($\log P_{oa}=2,50$) y su solubilidad en IPM ($0,19 \pm 0,03$ % p/v), que es el núcleo de la fase dispersa de la microemulsión o/a. Con el porcentaje de IPM (5%) incorporado en la microemulsión para realizar este estudio se origina un núcleo lipófilo, disminuyendo la penetración de IPM en la monocapa del tensioactivo, como se puede deducir del aumento del PIT para este porcentaje de aceite (*apartado 5.1.6.3.*), dando lugar a la formación de más gotículas de fase interna esféricas. Esto explicaría que las microemulsiones constituidas por IPM/Brij® 96/propilenglicol/agua incrementen significativamente la solubilización de nifedipino con respecto a las soluciones micelares con concentración equivalente de tensioactivo/cotensioactivo por dos motivos: 1) origina un lugar potencial para la solubilización del nifedipino (núcleo lipófilo) 2) aumenta la concentración de las cadenas de polioxietilen del tensioactivo (foco de solubilización del nifedipino) como consecuencia de la disminución en la penetración del IPM en la monocapa del tensioactivo.

5.1.7.5.-Incorporación de nifedipino en la microemulsión primaria o/a

- Método:

Para la incorporación del principio activo se selecciona, dentro del diagrama de fases, la microemulsión con un contenido en fase interna (IPM) del 15% y 30% de Brij® 96/propilenglicol, al ser este sistema el que presenta la mayor proporción de fase dispersa con el mínimo requerimiento de tensioactivo/cotensioactivo necesario para su formación.

Para determinar la máxima cantidad de nifedipino incorporado al sistema disperso, se adicionan a las mezclas IPM/ Brij® 96/propilenglicol cantidades crecientes de principio activo correspondientes a concentraciones teóricas de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Una vez dispersado el nifedipino en las mezclas mencionadas, se adiciona la fase acuosa, manteniéndose el sistema en agitación hasta la formación de la microemulsión. A continuación, se filtran las microemulsiones obtenidas a través de filtros de celulosa de $0,45 \mu\text{m}$ de tamaño de poro para eliminar el nifedipino en suspensión y, por lo tanto, no incorporado al sistema.

La cuantificación del principio activo presente en los distintos sistemas se realiza por HPLC, previa disolución de las microemulsiones obtenidas en metanol hasta obtener una concentración teórica de nifedipino de $20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. El número de muestras estudiadas para cada concentración es de tres ($n=21$) y los análisis de cada muestra se realizan por triplicado.

- Resultados y comentarios:

La figura 49 muestra los resultados obtenidos en los estudios realizados sobre la incorporación de nifedipino a la microemulsión o/a. Como se puede observar, el sistema constituido por IPM/ Brij® 96/propilenglicol/agua logra incorporar una cantidad máxima de nifedipino de $5,61 \pm 0,19 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Por lo tanto, con este sistema disperso se

logra incorporar 5,84 y 1,36 veces más de nifedipino que con los sistemas constituidos por IPM/ Brij® 96/agua; 10/25/65 (p/p/p) y IPM/ Brij® 96/PEG 400/agua; 15/30/60 (p/p/p), respectivamente.

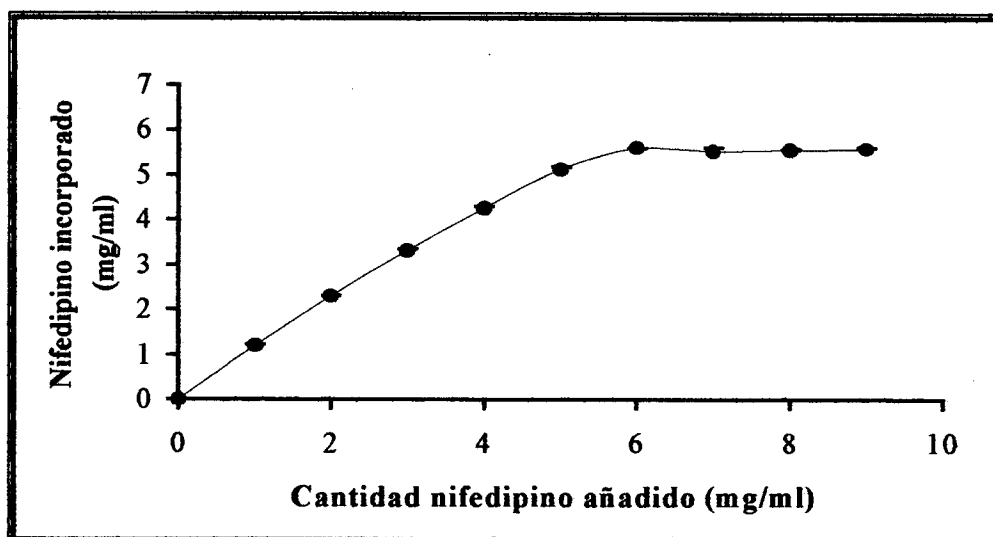


Figura 49. Cantidad de nifedipino incorporado a la microemulsión IPM/Brij® 96/propilenglicol/agua; 15/30/55 (p/p/p).

5.1.8.- Reología de las microemulsiones IPM/ Brij® 96/propilenglicol/agua

5.1.8.1.- Influencia de la relación Brij® 96/propilenglicol sobre el comportamiento reológico de las microemulsiones o/a

En esta sección se evalúa el efecto producido por la relación Brij® 96/propilenglicol sobre la reología y la viscosidad de las microemulsiones. La viscosidad y el comportamiento reológico son dos características físicas de gran importancia en los sistemas fluidos desde el punto de vista farmacotécnico, ya que van a condicionar en gran medida la manejabilidad y la vía de administración. Además, la viscosidad permite evaluar la estabilidad de los sistemas dispersos. Ambos parámetros se pueden determinar a partir de las representaciones gráficas de la fuerza de cizalla ejercida sobre el sistema en función del intervalo de cizalla sobre el cual se ejerce dicha fuerza. La figura 50 muestra los perfiles correspondientes a los comportamientos reológicos más habituales de los sistemas fluidos.

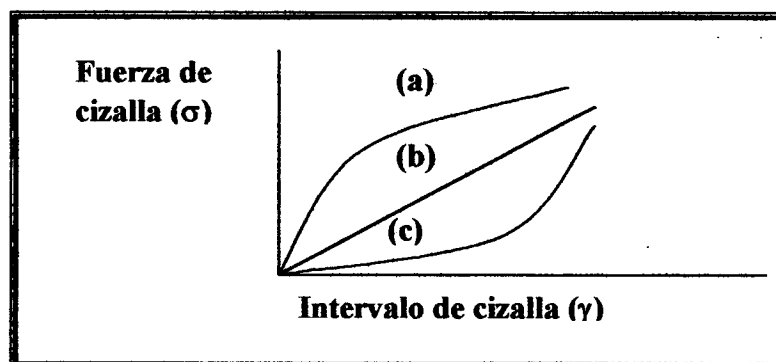


Figura 50. Perfiles reológicos más característicos de los sistemas fluidos

Los fluidos que presentan una proporcionalidad directa entre la fuerza de cizalla y el intervalo de cizalla, en cualquier punto de dicho intervalo, reciben el nombre de newtonianos y su representación gráfica corresponde a una recta (Figura 50.b) cuya pendiente es el valor de viscosidad de ese sistema, expresado por la siguiente ecuación:

$$\eta = \sigma \cdot \gamma^{-1}$$

Las representaciones (a) y (c) de la figura 50 muestran el comportamiento reológico de los fluidos que no presentan proporcionalidad directa entre los parámetros mencionados, recibiendo por ello la denominación de no newtonianos.

Dentro de los fluidos no newtonianos, los dos comportamientos más habituales son el pseudoplástico (representado en la figura 50.a) y el dilatante (representado en la figura 50.c). Aunque a priori, existen muy pocos fluidos que se puedan considerar como verdaderamente newtonianos, si que hay numerosos sistemas y líquidos de bajo peso molecular que se pueden catalogar como tales, y entre ellos se pueden encontrar presumiblemente las microemulsiones.

- Método:

En la presente memoria todas las medidas se realizan con un viscosímetro de disco rotatorio Brookfield modelo HB, dotado de un sistema informático de procesamiento de datos Rheocalc V1.1. Las medidas se efectúan a una temperatura de 25°C, y el disco empleado es el CP-41, adecuado para líquidos con viscosidades menores a 975 cps, siendo el número de determinaciones por muestra de 3 (n=3).

Los ensayos se realizan sobre microemulsiones con el mismo contenido de fase interna (5% en peso), tensioactivos totales (30% en peso) y fase externa (65% en peso), variando únicamente la relación Brij® 96/propilenglicol en el intervalo comprendido entre 2:1 y 4:1, p/p. Se realizan 3 determinaciones por muestra para un total de 3 muestras (n=9).

El comportamiento reológico de las microemulsiones se estudió en ciclos de "subida y bajada" con velocidades de giro de disco comprendidas entre 0 y 25 r.p.m. Si los perfiles corresponden a fluidos newtonianos, el valor de la viscosidad se determina a partir de la pendiente de la recta, obtenida al representar gráficamente la fuerza de cizalla/intervalo de cizalla. Sin embargo, en el caso de que se traten de fluidos no newtonianos, el valor de viscosidad se obtiene a partir del valor calculado por el viscosímetro a la máxima velocidad de giro del disco (25 r.p.m.).

- Resultados y comentarios:

La figura 51 muestra el comportamiento reológico de las microemulsiones estudiadas a partir de la representación gráfica de la fuerza de cizalla realizada sobre el sistema en función del intervalo de cizalla sobre el que se ejerce. Como se puede observar, a excepción de los sistemas que presentan en su composición una proporción tensioactivo/cotensioactivo 2:1, las demás microemulsiones demuestran tener un comportamiento newtoniano, con valores de coeficientes de determinación próximos a

la unidad. Debido a las propiedades mencionadas, los valores de viscosidad se obtienen a partir de las pendientes de las rectas del intervalo de cizalla/fuerza para todos los sistemas dispersos a excepción del no newtoniano, donde el valor de dicho parámetro se calcula por el viscosímetro a la máxima velocidad de giro de disco (25 r.p.m.).

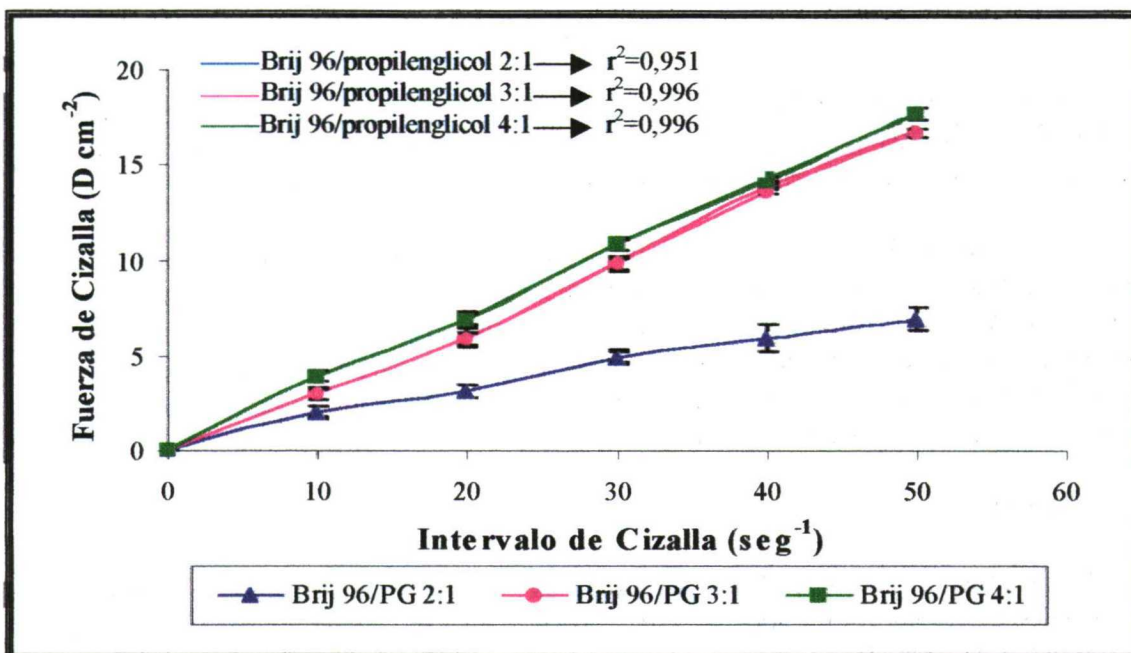


Figura 51. Comportamiento reológico de las microemulsiones en función de la proporción Brij[®] 96/propilenglicol (p/p).

La figura 52 refleja las variaciones en la viscosidad de las microemulsiones IPM/ Brij[®] 96/propilenglicol/agua, producidas por las distintas proporciones Brij[®] 96/propilenglicol estudiadas.

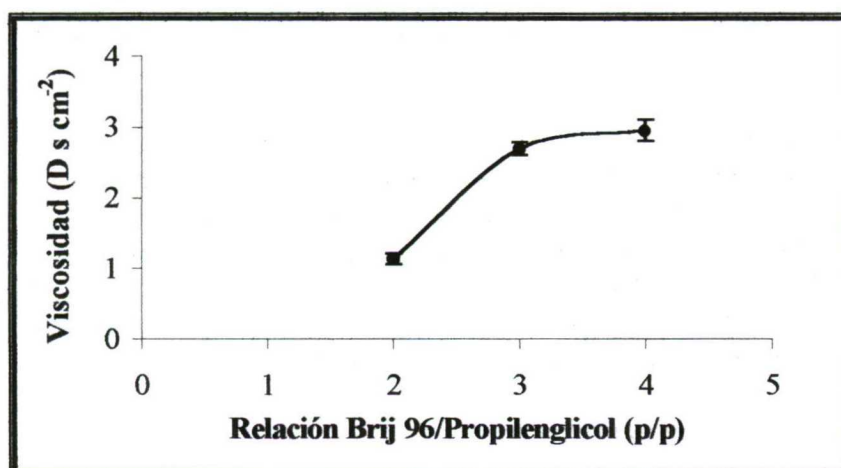


Figura 52. Influencia de la proporción Brij[®] 96/propilenglicol (p/p) sobre la viscosidad de las microemulsiones

Los resultados obtenidos permiten afirmar que la viscosidad de las microemulsiones estudiadas aumenta a medida que lo hace la proporción Brij[®] 96/propilenglicol, siendo este aumento más significativo al pasar de la relación 2:1 a 3:1.

5.1.8.2.- Influencia del contenido total Brij® 96/propilenglicol sobre el comportamiento reológico de las microemulsiones o/a

En este apartado se evalúa el efecto producido por la variación del contenido total en tensioactivo/cotensioactivo sobre la reología y la viscosidad de los sistemas dispersos objeto de nuestro estudio.

- Método:

Los ensayos se realizan sobre microemulsiones con el mismo contenido en fase interna (15% en peso) y una proporción variable de tensioactivo/cotensioactivo y, por tanto de fase acuosa, dentro del intervalo comprendido entre el 25 y el 40% en peso, con una relación Brij® 96/propilenglicol de 2:1 (p/p). Las medidas se efectúan con el mismo equipo y las mismas condiciones empleadas en la sección anterior. Se realizan tres determinaciones por muestra para un total de 4 muestras (n=12).

- Resultados y comentarios:

La figura 53 muestra el comportamiento reológico de las microemulsiones o/a estudiadas a partir de la representación gráfica fuerza de cizalla/intervalo de cizalla.

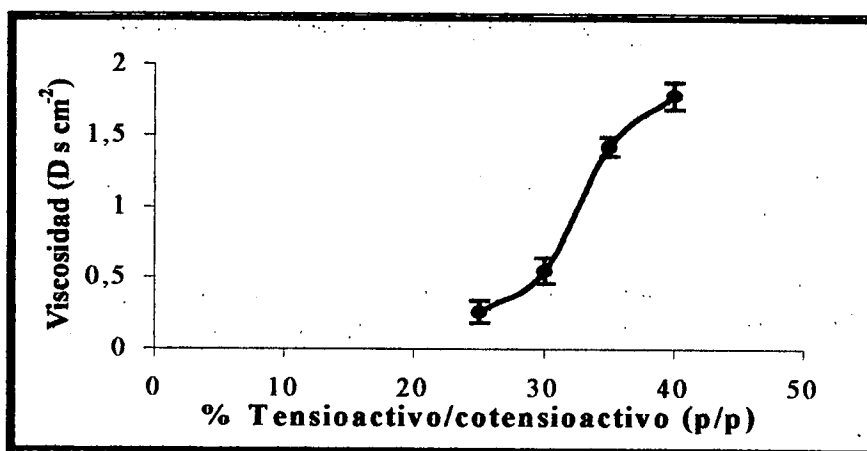


Figura 53. Comportamiento reológico de las microemulsiones en función de su contenido total en tensioactivo/cotensioactivo (Brij® 96 y propilenglicol).

Las microemulsiones estudiadas presentan coeficientes de determinación muy próximos a la unidad ($\approx 0,99$), por lo que todos los sistemas se consideraron como fluidos newtonianos y el valor de viscosidad se determina a partir de la pendiente de la recta intervalo/fuerza de cizalla.

La figura 54 representa las variaciones de la viscosidad de las microemulsiones o/a en función de su contenido en fase interna.

Los resultados obtenidos permiten confirmar que la viscosidad de las microemulsiones estudiadas es un parámetro dependiente del contenido total en Brij® 96 y propilenglicol presente en las mismas, aumentando con los incrementos de las

proporciones en peso de dichos tensioactivos. Este aumento es más significativo al pasar del 30% al 35% del contenido total, en peso, de tensioactivo/cotensioactivo.

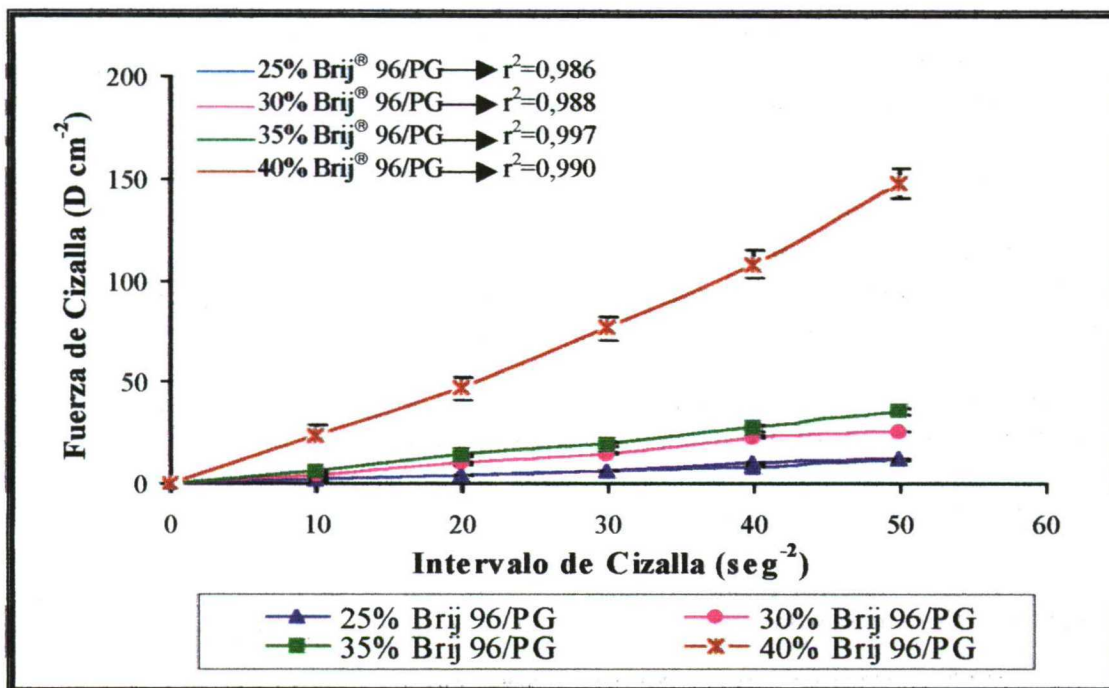


Figura 54. Influencia del contenido total tensioactivo/cotensioactivo sobre la viscosidad de las microemulsiones.

5.1.8.3.- Influencia del contenido en fase interna sobre el comportamiento reológico de las microemulsiones o/a

En esta sección se evalúa el efecto producido por la variación del contenido en fase oleosa (IPM) sobre la reología y la viscosidad de los sistemas dispersos objeto de estudio.

- Método:

Los ensayos se realizan sobre las microemulsiones que presentan el mismo contenido en Brij[®] 96/propilenglicol (30%) con una relación fija (2:1, p/p) y una proporción variable de fase oleosa dentro del intervalo comprendido entre el 5 y el 15% en peso. Las medidas se efectúan con el mismo aparato y en las mismas condiciones empleadas en los apartados anteriores.

Se realizan 3 determinaciones por muestra para un total de 3 muestras (n=9).

- Resultados y comentarios:

La figura 55 muestra el comportamiento reológico de las microemulsiones estudiadas a partir de la representación gráfica fuerza de cizalla/intervalo de cizalla.

Como se puede comprobar, todos los sistemas estudiados muestran un comportamiento newtoniano, ya que presentan valores de coeficiente de determinación muy próximos a la unidad ($\approx 0,99$). El valor de viscosidad de los sistemas se determina a partir de la pendiente de la recta intervalo/fuerza de cizalla.

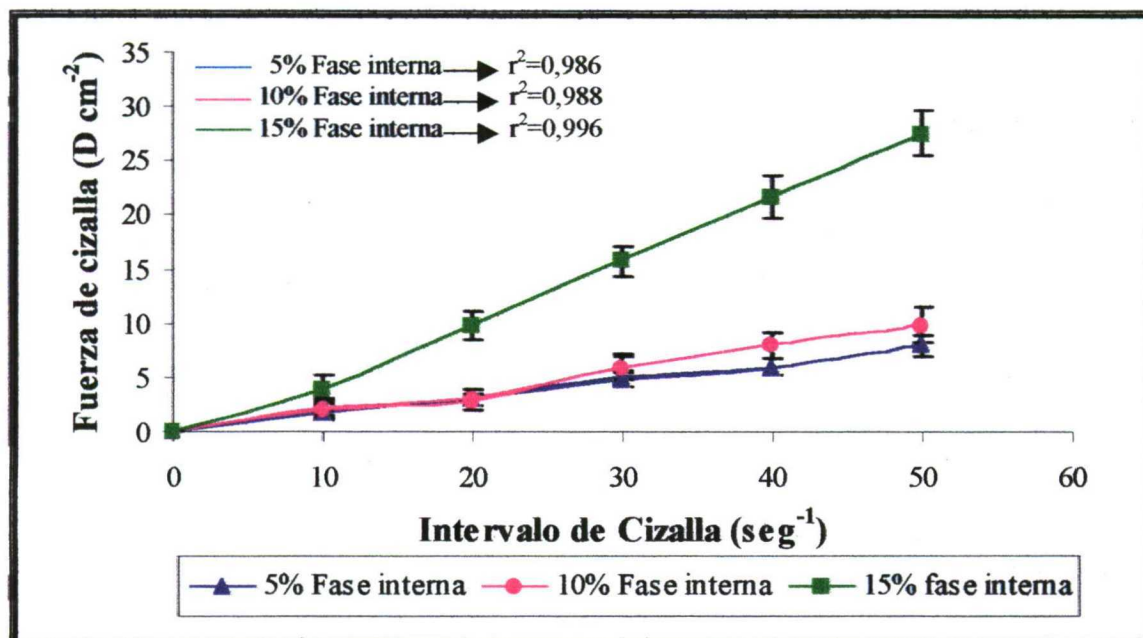


Figura 55. Comportamiento reológico de las microemulsiones en función de su contenido en fase interna (IPM).

La figura 56 representa las variaciones en la viscosidad de las microemulsiones en función de su contenido en fase interna.

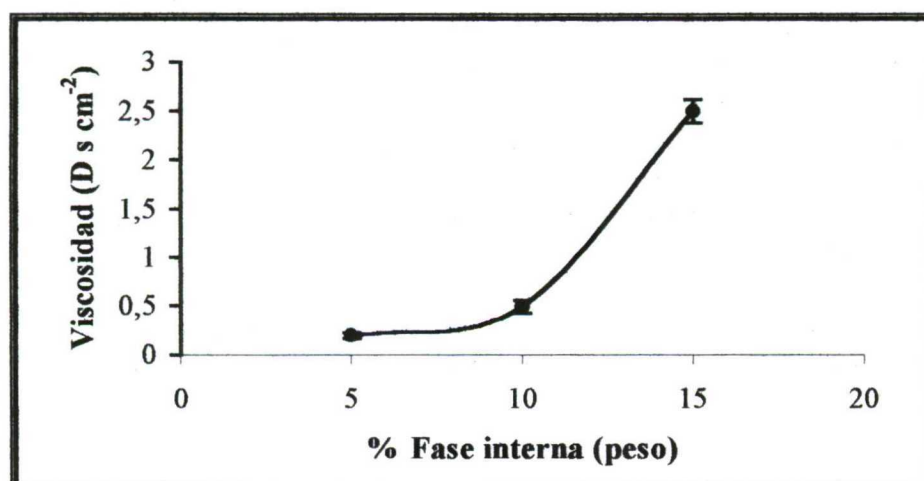


Figura 56. Influencia de la fase interna sobre la viscosidad de las microemulsiones o/a.

Los resultados obtenidos muestran que la viscosidad de las microemulsiones estudiadas está influenciada por la proporción de la fase oleosa presente en las mismas, aumentando el valor dicho parámetro al incrementar su contenido en dicho

componente. Este aumento de la viscosidad es más significativo al pasar de un 10 a un 15% en peso de fase interna.

5.1.9.- Estudio del tamaño de gotícula de la fase interna de las microemulsiones IPM/Brij® 96/propilenglicol/agua

5.1.9.1.- Influencia de la relación Brij® 96/propilenglicol sobre el tamaño de gotícula de la fase dispersa

El estudio se realiza con el objetivo de evaluar las variaciones en el radio hidrodinámico de las gotículas constituyentes de la fase interna de las microemulsiones o/a, en función de las distintas relaciones, en peso, de tensioactivo/cotensioactivo presentes en las mismas.

- Método:

Los ensayos se realizan sobre microemulsiones con el mismo contenido en fase interna (5% en peso), tensioactivo/cotensioactivo total (30% en peso) y fase externa (65% en peso), variándose únicamente la relación Brij® 96/propilenglicol dentro del intervalo comprendido entre 2:1 y 4:1 (p/p).

La determinación de los radios hidrodinámicos (R_h) de las gotículas constituyentes de las microemulsiones se realiza por espectrofotometría de correlación fotónica, también denominada PCS o "light scattering".

Esta técnica opera en función del choque existente entre las partículas o macromoléculas en disolución con las moléculas de disolvente, dando lugar a un movimiento constante al azar, llamado Browniano. Por efecto Doppler de intensidades, este movimiento produce un ensanchamiento de la frecuencia de la luz difundida respecto a la incidente. Este ensanchamiento también se puede interpretar como variaciones en la intensidad de luz difundida provocadas por el movimiento colectivo de las moléculas que causa fluctuaciones temporales de la constante dieléctrica. Por lo tanto, la espectrofotometría de correlación fotónica estudia las propias fluctuaciones en la intensidad de luz difundida, obteniéndose la función de autocorrelación de intensidades $G^{(2)}(t)$.

La función de autocorrelación de intensidades está relacionada con la función de autocorrelación del campo eléctrico, $G^{(1)}(t)$ a través de la relación de Siegert:

$$G^{(2)}(t) = \langle I_d \rangle^2 + |G^{(1)}(t)|^2 \quad (1)$$

Si normalizamos la ecuación 1 obtenemos la función de autocorrelación de intensidades normalizada, $g^{(2)}(t)$:

$$g^{(2)}(t) = 1 + \beta |g^{(1)}(t)|^2 \quad (2)$$

En disoluciones diluidas, como es el caso de las microemulsiones (Cazabat y cols., 1980), la función de autocorrelación $g^{(1)}(t)$ se obtiene partiendo de la ecuación de difusión que cumple la variación de densidad de partículas:

$$\frac{d}{dt'} = \delta c(r, t') = DV^2 \delta c(r, t') \quad (3)$$

La transformada de Fourier de la ecuación anterior, que indica un decaimiento exponencial de las fluctuaciones de densidad con el tiempo, es la siguiente:

$$\frac{d}{dt'} = \delta c(q, t') = -Dq^2 \delta c(q, t') \quad (4)$$

A partir de la correspondiente transformada de Fourier se obtiene la función de autocorrelación:

$$g^{(1)}(t) = e^{-\Gamma t} = e^{-Dq^2 t} \quad (5)$$

De la función de autocorrelación $g^{(1)}(t)$ se obtiene la siguiente igualdad:

$$\Gamma = D \cdot q^2 \quad (6)$$

donde:

- q es el vector onda:

$$q = \frac{4\pi n_0}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (7)$$

- La velocidad de decaimiento (Γ) es la inversa del tiempo de relajación (τ).

- D es el coeficiente de difusión traslacional y está relacionado, a través de la ecuación de Stokes-Einstein, con la constante de Boltzman, la temperatura, y el factor de fricción f , que en el caso más simple de partículas esféricas está relacionado con la viscosidad, η y el radio hidrodinámico, R_h :

$$D = \frac{k_B T}{f}; f(\text{esfera}) = 6\pi\eta R_h \quad (8)$$

El equipo que se ha empleado para realizar las medidas consiste básicamente en

una fuente de radiación, un baño termostático en donde se encuentra la muestra y un fotomultiplicador que recoge la radiación dispersada y la envía a un correlador.

La fuente de radiación es un láser de Ar^+ de la casa Coherent, modelo Innova 300, que proporciona luz polarizada verticalmente en modo TEM_{00} . La luz antes de llegar a la muestra se hace pasar por una lente que enfoca el haz en el centro de la misma, después una apertura filtra el haz, aumentando su pureza (perfil gaussiano).

La muestra se sitúa dentro de una célula de cuarzo que es un cilindro con una sola base, en la superficie cilíndrica las dos partes diametralmente opuestas por las que entra y sale el haz están pulidas. Esta célula se llena con agua desionizada, que tiene dos misiones: por un lado, mantiene constante la temperatura de la muestra y por otro lado, debido a que los índices de refracción del agua y del cuarzo son parecidos, reduce en gran medida las reflexiones. Para evitar que el baño tenga partículas de polvo en suspensión que interfieran en las medidas, se utiliza una bomba peristáltica que hace pasar el agua por un prefiltro de celulosa tipo "A/E glass" y después por un filtro de nylon con $0,2\ \mu\text{m}$ de poro, ambos de la casa Gelman Sciences. La temperatura del baño se mide con una resistencia de platino PT100.

El fotomultiplicador (Malvern) está montado sobre un brazo giratorio Malvern modelo PCS7. Antes de comenzar la medida, es necesario alinear el multiplicador para recoger únicamente la radiación que proviene del volumen, muy pequeño, de la muestra que es iluminado por el haz del láser. El fotomultiplicador transforma cada electrón que recibe en un chorro de 10^6 electrones a su salida un convertidor, analógico-digital, que es también discriminador y amplificador, que elimina los pulsos de baja intensidad y transforma los demás en pulsos lógicos TTL. Estos son los que recibe el correlador Malvern, Serie 7032 Multi-8 que cuenta con 256 canales. Por último, un ordenador en el que está instalado el software PCS de Malvern controla el motor del fotomultiplicador, así como el correlador y procesa parcialmente la información que le llega de este último.

Para poder realizar las medidas de las muestras se emplean unas células con un diámetro de 1 cm, y un volumen aproximado de 3 ml. El cuerpo de la célula es un cilindro sin base formado por una sola pieza de cuarzo pulido, al que se ha añadido una base y una cabeza con rosca para permitir el cierre de la célula mediante un tapón de teflon. De esta manera las disoluciones pueden permanecer durante un tiempo sin perder disolvente y se pueden realizar varias medidas con la misma muestra.

En la preparación de las muestras es fundamental evitar la presencia de polvo. Antes de utilizar las células es necesario limpiarlas en corriente de acetona, para ello se emplea un destilador de acetona que posee una columna con un soporte para colocar las células. Los tapones de teflon se limpian con acetona filtrada, para lo cual se emplean filtros de nylon con $0,22\ \mu\text{m}$ de poro de Gelman Sciences. Una vez terminado este proceso las células se tapan y pasan a una cabina de flujo laminar que crea una atmósfera libre de polvo y allí se mantienen durante el tiempo de preparación de las muestras. Todos los componentes que constituyen la microemulsión son previamente filtrados a través de filtros de nylon (Millipore), para los componentes hidrófilos, y de PVDF (Millipore), para los componentes lipófilos, con un tamaño de poro de $0,22\ \mu\text{m}$.

Las microemulsiones se preparan en una cabina de flujo laminar y se filtran a través de un filtro de nylon 0,22 μm (Millipore) a medida que se llenan las células hasta un volumen aproximado de 1 ml. Una vez llenadas las células se tapan herméticamente con un tapón de teflon y se dejaron reposar las preparaciones durante 7 días antes de realizar las medidas. Se realizan 3 determinaciones por muestra para un total de 3 muestras.

Las condiciones experimentales empleadas, durante el proceso de medida de las muestras, en la técnica espectroscópica de correlación fotónica se muestran en el siguiente cuadro:

Potencia del láser	0,110 vatios
Longitud de onda (λ)	514,5 nm
Tamaño de apertura del fotomultiplicador	200 μm
Temperatura	25 °C
Factor de dilación	4
Escala de tiempo	0,1 μs
Ángulo de medida (θ)	90°

Cuadro 6. Condiciones experimentales de los análisis realizados mediante PCS.

El índice de refracción (n_0) para todas las muestras ensayadas corresponde al del componente en mayor proporción presente de las mismas (agua), con un valor igual a la unidad. Los valores de viscosidad empleados en cada una de las microemulsiones analizadas corresponden a los determinados en el apartado 5.1.8.1. Ambos parámetros son imprescindibles para la determinación del radio hidrodinámico de las microemulsiones.

Finalmente, las funciones de correlación experimentales obtenidas para cada muestra se analizan con el programa REPES, realizando el ajuste de los datos experimentales con una probabilidad de 0,1.

Los valores de velocidad de decaimiento (Γ) obtenidos con este programa al analizar las muestras permite por sustitución en la ecuación (6) determinar el valor del coeficiente de difusión transaccional (D), previa determinación del vector onda (q) (ecuación 7). Por sustitución de D en la ecuación (8) obtendremos el valor del radio hidrodinámico.

- Resultados y comentarios:

En la figura 57 se observa las variaciones en el radio hidrodinámico de la gotículas de las microemulsiones primarias o/a en función de la relación Brij® 96/propilenglicol.

La relación tensioactivo/cotensioactivo ejerce cierta influencia en el tamaño de gotícula, observándose un aumento progresivo en este parámetro a medida que se

aumenta la cantidad de Brij® 96 frente a la proporción de propilenglicol en estos sistemas.

Estos resultados demuestran la eficacia del propilenglicol como cotensioactivo disminuyendo la tensión interfacial aceite y agua, favoreciendo la reducción del tamaño de gotícula de las microemulsiones estudiadas y el área de formación de las microemulsiones.

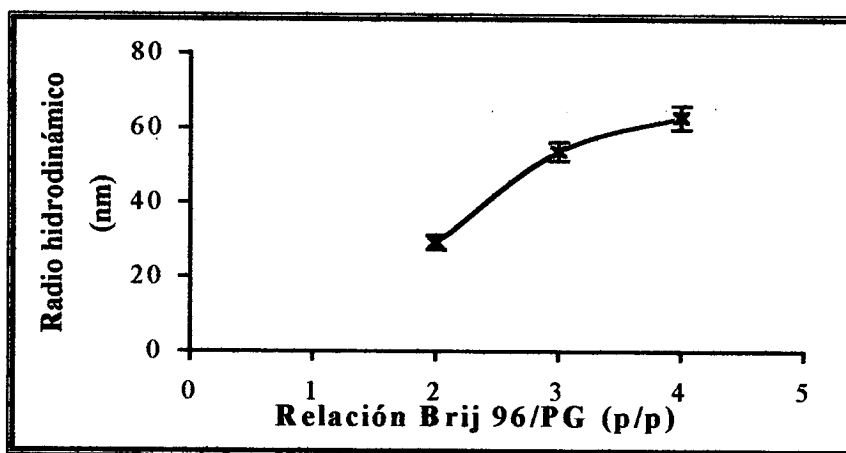


Figura 57. Influencia de la relación Brij® 96/propilenglicol sobre el tamaño de gotícula de las microemulsiones o/a.

5.1.9.2.- Influencia del contenido total Brij® 96/propilenglicol sobre el tamaño de gotícula de la fase dispersa

En esta sección se evalúa el efecto producido por la variación del contenido total en tensioactivo/cotensioactivo sobre el radio hidrodinámico de las gotículas que constituyen la fase dispersa de las microemulsiones estudiadas.

- Método:

Los ensayos se realizan sobre microemulsiones con el mismo contenido en fase interna (15% en peso) y una proporción variable en tensioactivo/cotensioactivo dentro del intervalo comprendido entre el 25 y el 40% en peso, con una relación fija Brij® 96/propilenglicol correspondiente 2:1 (p/p). Las medidas se realizan con la misma técnica y las mismas condiciones empleadas en el apartado anterior. Se ensayan 3 determinaciones por muestra para un total de 4 muestras.

- Resultados y comentarios:

La figura 58 representa las variaciones en el radio hidrodinámico de las gotículas de las microemulsiones en función de su contenido total en tensioactivo/cotensioactivo. Como se puede observar, el tamaño de gotícula de las microemulsiones primarias o/a se ve influenciado por el contenido total de tensioactivo/cotensioactivo presente en las mismas, disminuyendo el tamaño de gotícula a medida que se incrementa el contenido total de Brij® 96/propilenglicol.

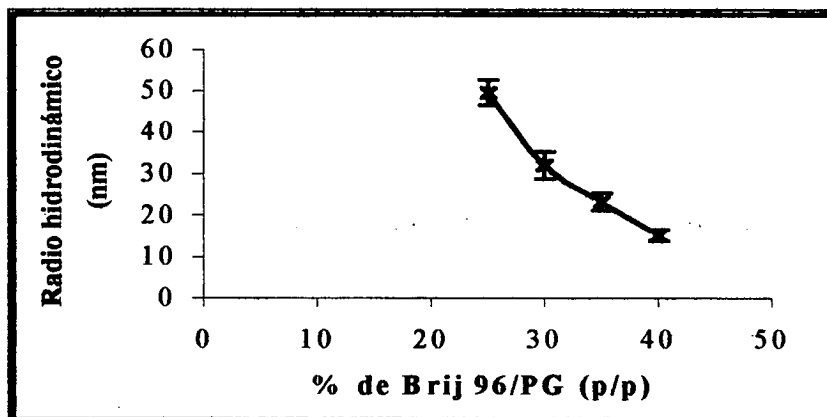


Figura 58. Influencia del contenido total en tensioactivo/ cotensioactivo sobre el tamaño de gotícula de las microemulsiones o/a.

5.1.9.3.- Influencia del contenido en fase interna sobre el tamaño de gotícula de la microemulsión o/a

En esta sección se evalúa el efecto producido por la variación del contenido en fase interna (IPM) sobre el radio hidrodinámico de las gotículas constituyentes de los sistemas dispersos objeto de estudio.

- Método:

Los ensayos se realizan sobre microemulsiones que presentan el mismo contenido en tensioactivos (30% en peso) con una relación fija (2:1, p/p) y una proporción variable de fase oleosa dentro del intervalo comprendido entre el 5 y el 15% en peso. Las medidas se efectúan con la misma técnica y las mismas condiciones empleadas en los apartados anteriores. El número de determinaciones por muestra es de 3 para un total de 3 muestras.

- Resultados y comentarios:

La figura 59 representa las variaciones en el radio hidrodinámico de las gotículas de las microemulsiones primarias o/a en función de su contenido en fase interna.

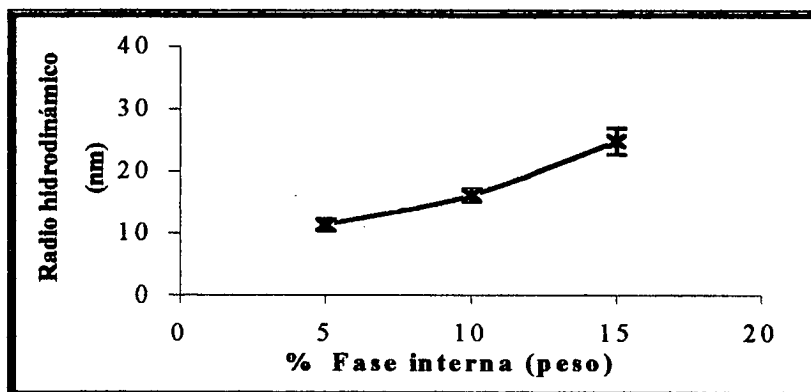


Figura 59. Influencia del contenido en fase interna sobre el tamaño de gotícula de las microemulsiones o/a.

El tamaño de gotícula se encuentra influenciado por el contenido en fase interna presente en las microemulsiones, incrementándose este parámetro a medida que aumenta el contenido de IPM.

5.2.- Microemulsiones múltiples o/a/o constituidas por microemulsión primaria o/a, Brij® 96 y IPM

Una vez seleccionada la microemulsión primaria o/a constituida por IPM/Brij® 96/propilenglicol/agua 15:30:55 (p/p/p) en función de la cantidad incorporada de fase interna y de nifedipino solubilizado, se procede al desarrollo galénico y caracterización de las microemulsiones múltiples en las que se utiliza la microemulsión primaria o/a como fase interna, Brij® 96 como tensioactivo, propilenglicol y PEG 400 como cotensioactivos y IPM como fase externa.

5.2.1.- Componentes de las microemulsiones múltiples o/a/o

A – Microemulsión primaria (o/a) (IPM/ Brij® 96/propilenglicol/agua):

Constituye la fase interna de las microemulsiones múltiples o/a/o, y está constituida por 15% de IPM, 30% de Brij® 96/propilenglicol (2:1; p/p) y 55% de agua. Su desarrollo galénico y caracterización se describen en el apartado 5.1.7.

B- Fase Oleosa:

Constituye la fase externa de nuestros sistemas dispersos, y como componente se selecciona el miristato de isopropilo (IPM), descrito de forma detallada en el apartado 5.1.1. de esta memoria.

C - Tensioactivo:

Como tensioactivo se selecciona el Brij® 96 por su capacidad de originar una gran área de formación de microemulsiones (apartado 5.1.4.2). Se describe ampliamente en el apartado 5.1.4.1.

5.2.2.- Diseño de microemulsiones múltiples o/a/o

Para determinar la composición de las microemulsiones múltiples o/a/o, se construyen los diagramas de fases ternarios con los componentes de la formulación y se delimita el área correspondiente a estos sistemas.

- Método:

Para la construcción de los diagramas de fases se sigue un método que consta de dos etapas (Ferreira y cols., 1994a). En la primera etapa se desarrolla la microemulsión primaria o/a (apartado 5.1.7.) y en la segunda etapa se valora volumétricamente a 25°C

la microemulsión primaria o/a (IPM/Brij® 96/propilenglicol/agua (15/30/55; p/p/p)) con una mezcla constituida por IPM y Brij® 96, agitándose las mezclas resultantes el tiempo suficiente para alcanzar el equilibrio.

Aquellos sistemas que presentan transparencia e isotropía óptica, al observar su comportamiento mediante la luz polarizada a través de prismas de Nicols, se consideran como microemulsiones, pudiéndose delimitar las regiones de los distintos diagramas correspondientes a las áreas de formación de dichos sistemas dispersos. Se realizan ensayos de tipo cualitativo para determinar el signo de la microemulsión múltiple:

1) El ensayo de dilución consiste en observar la microemulsión múltiple a medida que se diluye con la fase externa (IPM) para ver si se producen fenómenos de separación de fases. Si el IPM se dispersa fácilmente en la fase continua la microemulsión múltiple será de fase externa oleosa.

2) El ensayo de solubilidad de un colorante en la fase continua se basa en la adición de Sudán III (colorante liposoluble) a la fase externa de la microemulsión múltiple o/a/o. La tinción de la fase externa, después de la adición de este colorante liposoluble, indica que se tratan de múltiples microemulsiones con fase externa oleosa.

- Resultados y comentarios:

La figura 60 muestra el diagrama ternario de fases y el área de formación de microemulsiones múltiples constituidas por microemulsión primaria (o/a)/ Brij® 96/IPM.

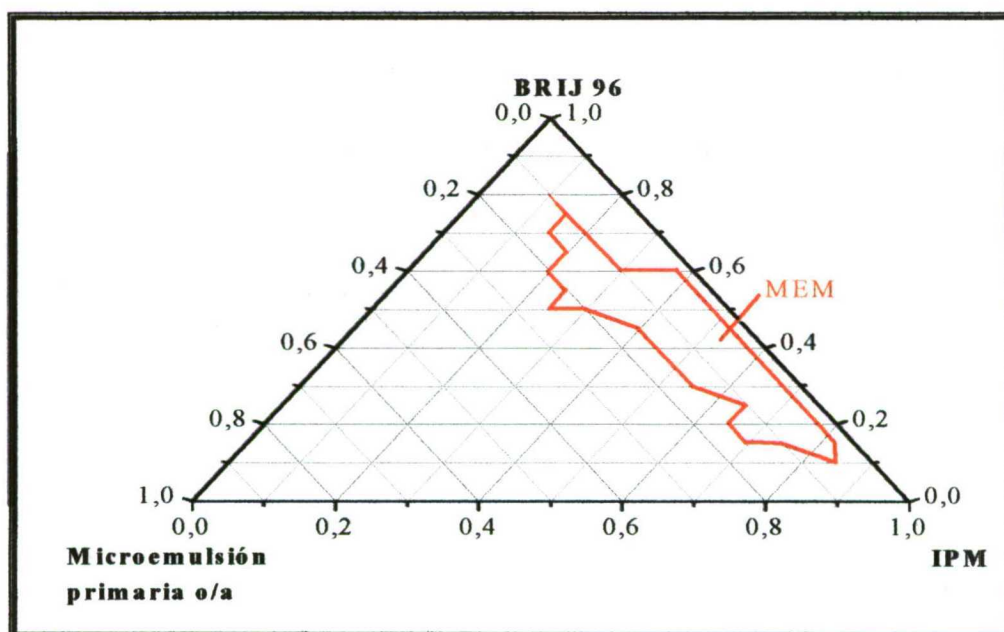


Figura 60. Diagrama de fases ternario y área de formación de microemulsiones múltiples o/a/o constituidas por microemulsión primaria (o/a)/ Brij® 96/IPM.

Como muestra la figura 60 se origina una gran área de formación de microemulsiones múltiples o/a/o empleando únicamente Brij® 96 como tensioactivo. La máxima cantidad incorporada de fase interna (microemulsión primaria o/a) es de un

25% con un 50% de tensioactivo. No obstante, la máxima cantidad de fase interna incorporada al sistema con una cantidad de tensioactivo adecuada para la administración transdérmica (30%) es de un 15%. La mínima cantidad incorporada de fase interna a la microemulsión múltiple o/a/o para ser considerada como tal es de un 2,5% para un 15% de tensioactivo.

Todas las microemulsiones formadas son estables a 25°C durante el mes que se observan para comprobar su estabilidad. Los ensayos de dilución y solubilización del colorante indican que son microemulsiones múltiples de fase externa oleosa.

5.3.- Microemulsiones múltiples o/a/o constituidas por microemulsión primaria o/a, Brij® 96, PEG 400 y IPM

El principal objetivo del desarrollo galénico de microemulsiones múltiples o/a/o es la incorporación de un cotensioactivo, como el PEG 400, con el fin de facilitar la incorporación de mayores cantidades de fase interna y por lo tanto de principio activo. Como cotensioactivo se selecciona el PEG 400 por su biocompatibilidad permitiendo, a las concentraciones requeridas para formar la forma farmacéutica, la administración transdérmica de la misma. Además, este cotensioactivo junto con el Brij® 96 es capaz de formar sistemas dispersos de fase externa oleosa.

5.3.1- Componentes de las microemulsiones múltiples o/a/o

A – Microemulsión primaria (o/a) (IPM/ Brij® 96/PEG 400/agua):

Constituye la fase interna de las microemulsiones múltiples o/a/o, y está constituida por 15% de IPM, 30% de Brij® 96/propilenglicol (2:1; p/p) y 55% de agua. Su desarrollo galénico y caracterización se han descrito en el apartado 5.1.7.

B- Fase Oleosa:

Constituye la fase externa de nuestros sistemas dispersos, y como componente se selecciona el miristato de isopropilo (IPM), descrito de forma detallada en el apartado 5.1.1. de esta memoria.

C - Tensioactivo:

Como tensioactivo se selecciona el Brij® 96 por su capacidad de originar una gran área de formación de microemulsiones (apartado 5.1.4.2). Se describe ampliamente en el apartado 5.1.4.1.

D – Cotensioactivo:

El cotensioactivo empleado para favorecer la formación de los sistemas dispersos y la incorporación de nifedipino es el PEG 400. Este cotensioactivo se describe ampliamente en el apartado 5.1.6.1.

5.3.2.- Diseño de las microemulsiones múltiples o/a/o

Para determinar la composición de las microemulsiones múltiples, se construyen los diagramas de fases pseudo-ternarios con los componentes de la formulación y se delimita el área correspondiente a estos sistemas dispersos.

- Método:

Para la construcción de los diagramas de fases se sigue un método que consta de dos etapas (Ferreira y cols., 1994a). En la primera etapa se desarrolla la microemulsión primaria o/a (apartado 5.1.7.), y en la segunda etapa se valora volumétricamente a 25°C la microemulsión primaria o/a (IPM/Brij® 96/propilenglicol/agua (15/30/55; p/p/p)) con una mezcla constituida por IPM, Brij® 96 y PEG 400, encontrándose estos dos últimos en proporciones definidas dentro del intervalo comprendido entre 1:1 y 4:1 (p/p). En el vértice superior del triángulo equilátero se sitúa el tensioactivo y el cotensioactivo, indicándose entre paréntesis la proporción correspondiente de ambos para cada diagrama de fases desarrollado.

Aquellos sistemas que presentan transparencia e isotropía óptica, al observar su comportamiento mediante la luz polarizada a través de prismas de Nicols, se consideran microemulsiones. De esta manera, se pueden delimitar las regiones de los distintos diagramas correspondientes a las áreas de formación de las microemulsiones múltiples o/a/o.

Se realizan ensayos de tipo cualitativo para determinar el signo de la microemulsión múltiple, al igual que se hizo en el apartado 5.2.2.: 1) ensayo de dilución de la fase externa con IPM y 2) ensayo de solubilidad de un colorante de carácter lipófilo (Sudán III) en la fase continua.

- Resultados y comentarios:

Los diagramas de fases pseudo-ternarios y las áreas de formación de las microemulsiones múltiples constituidas por microemulsión primaria (o/a)/ Brij® 96/PEG 400/IPM aparecen representados en las figuras 61 a 64.

Los resultados obtenidos en los distintos diagramas pseudo-ternarios muestran la gran influencia que ejercen las distintas proporciones Brij® 96/PEG 400 sobre el tamaño del área de formación de las microemulsiones múltiples y la cantidad de fase interna (microemulsión primaria o/a) incorporada al sistema disperso.

A medida que aumentan las proporciones Brij® 96/PEG 400 desde 1:1 hasta 3:1 se incrementa significativamente el área de formación de microemulsiones múltiples, para disminuir posteriormente con la proporción tensioactivo/cotensioactivo 4:1.

La máxima cantidad de fase interna (microemulsión primaria o/a) que se incorpora en las microemulsiones múltiples con unos requerimientos adecuados de tensioactivo/cotensioactivo para la administración transdérmica es del 25% para los sistemas dispersos con una proporción Brij® 96/PEG 400 de 1:1, 2:1 y 3:1.

Sin embargo, de todos los sistemas dispersos mencionados anteriormente se seleccionan aquellos constituidos por microemulsión primaria (o/a)/ Brij® 96/PEG 400/IPM con una proporción tensioactivo/cotensioactivo de 3:1, debido a que el área de formación de microemulsiones múltiples o/a/o originado es mayor que la del resto de las proporciones.

Este hecho es de gran importancia a la hora de incorporar el principio activo a las microemulsiones múltiples, ya que se deben seleccionar aquellos sistemas dispersos localizados en el interior, no en los límites, del área de formación de los mismos con el fin de evitar problemas de estabilidad que normalmente suelen producirse. Además, cuanto más grande es el área de formación de las microemulsiones múltiples o/a/o, mejor se podrá caracterizar las microemulsiones múltiples en función de una serie de parámetros como el contenido en fase interna, proporción tensioactivo/cotensioactivo y contenido total Brij® 96/PEG 400.

Por último, debemos destacar que la utilización de PEG 400 como cotensioactivo permite incorporar a la microemulsiones múltiples, constituidas por microemulsión primaria (o/a)/ Brij® 96/PEG 400/IPM, un 10% más de fase interna que aquellas microemulsiones múltiples desarrolladas sin cotensioactivo (apartado 5.2.1.2).

Los ensayos de dilución y solubilización de un colorante soluble en la fase externa confirman que las microemulsiones múltiples son de fase externa oleosa.

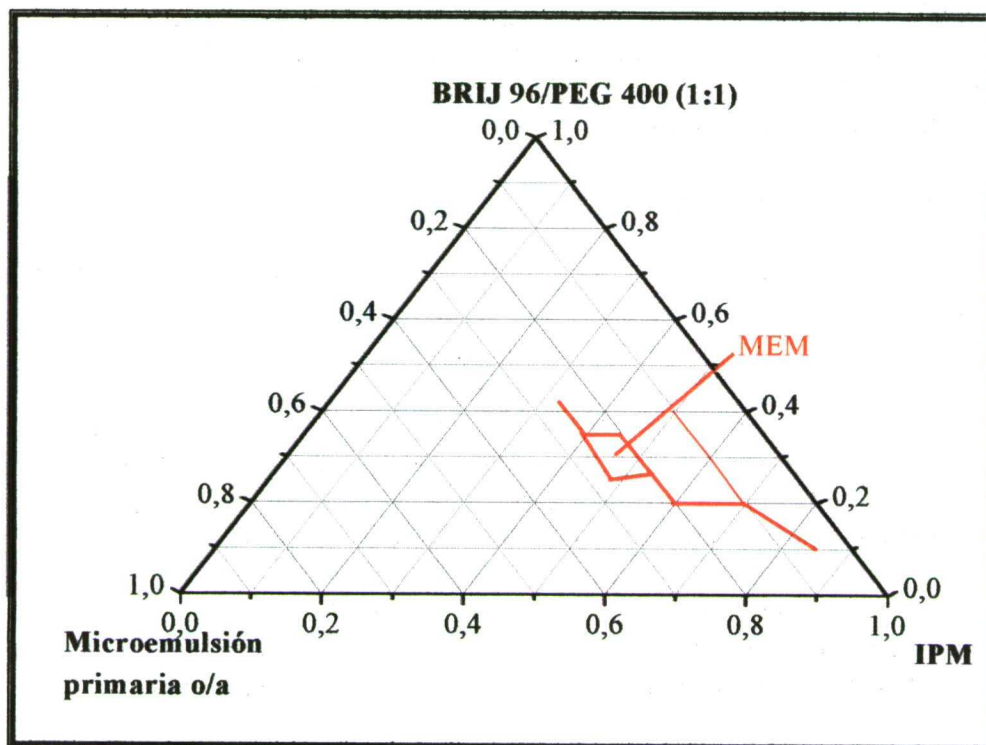


Figura 61. Diagramas de fases pseudo-ternario y área de formación de microemulsiones múltiples o/a/o para sistemas constituidos por microemulsión primaria (o/a)/Brij® 96/PEG 400/IPM con una proporción Brij® 96/PEG 400 de 1:1 (p/p).

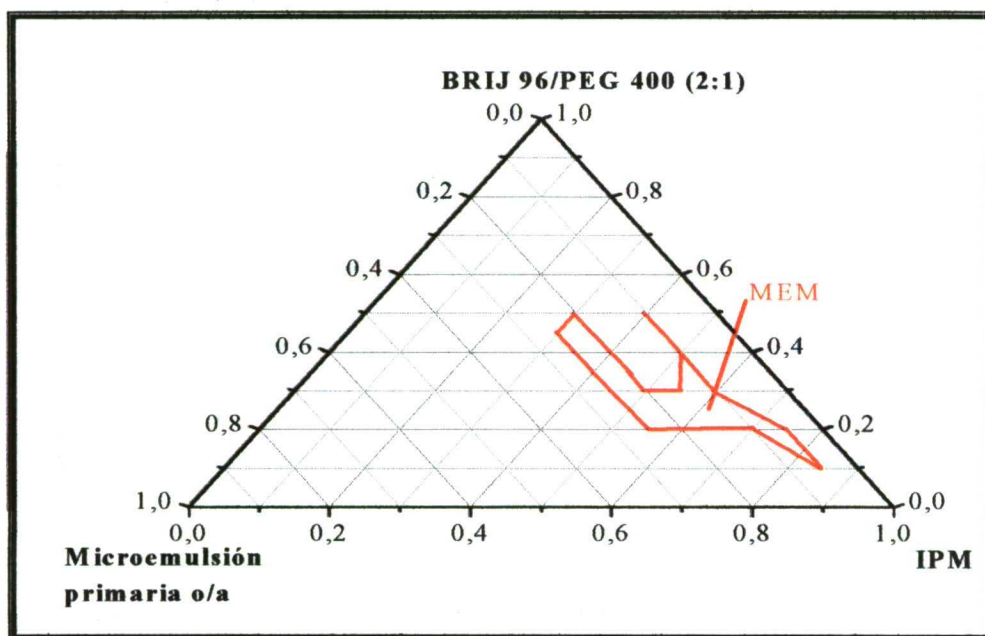


Figura 62. Diagrama de fases pseudo-ternario y área de formación de microemulsiones múltiples para sistemas constituidos por microemulsión primaria (o/a)/Brij® 96/PEG 400/IPM con una proporción Brij® 96/PEG 400 de 2:1 (p/p).

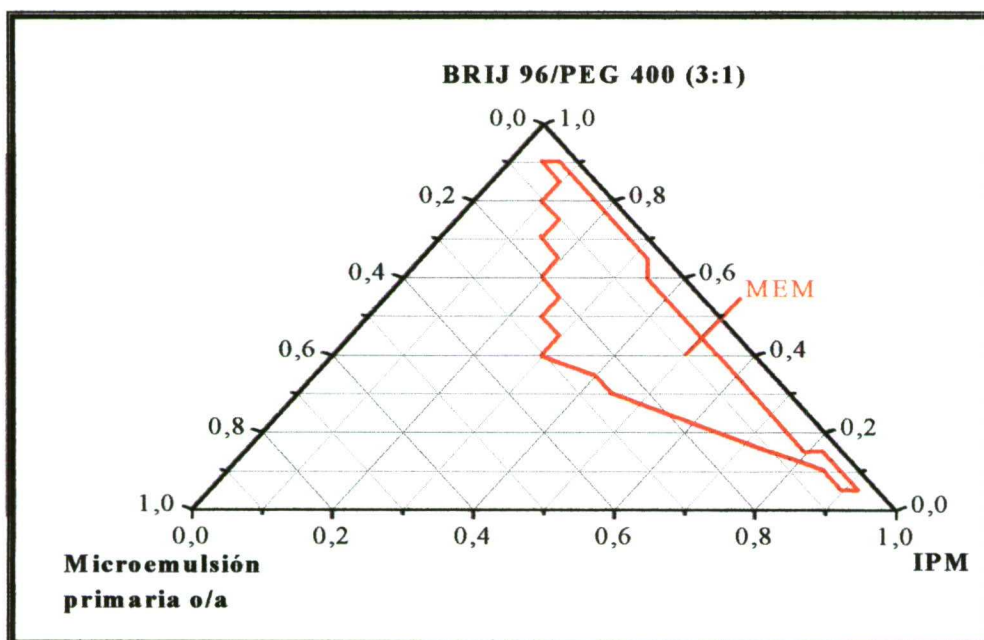


Figura 63. Diagrama de fases pseudo-ternario y área de formación de microemulsiones múltiples para sistemas constituidos por microemulsión primaria (o/a)/Brij® 96/PEG 400/IPM con una proporción Brij® 96/PEG 400 de 3:1 (p/p).

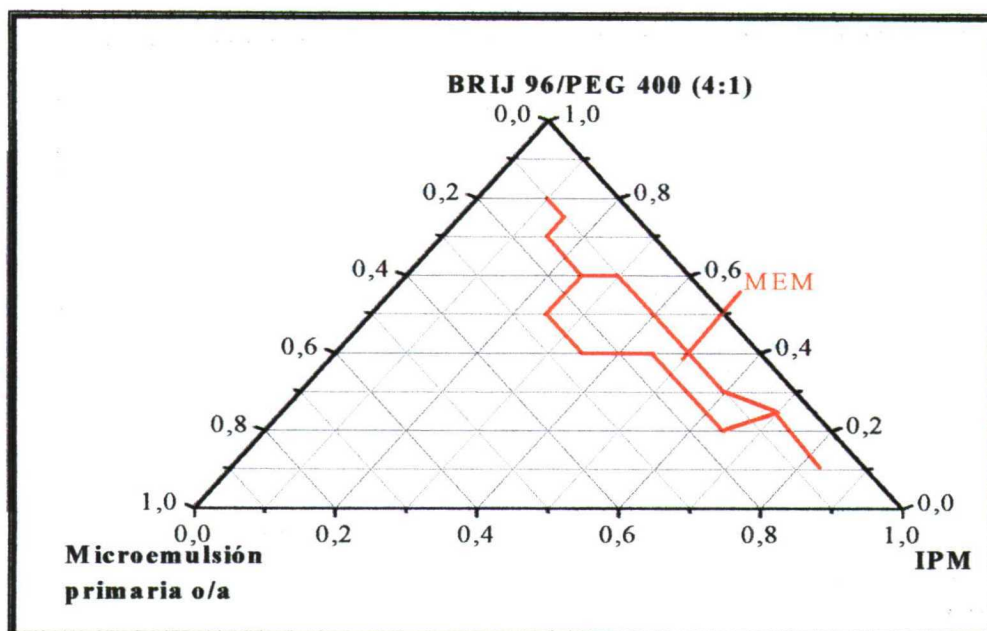


Figura 64. Diagrama de fases pseudo-ternario y área de formación de microemulsiones múltiples para sistemas constituidos por microemulsión primaria (o/a)/Brij® 96/PEG 400/IPM con una proporción Brij® 96/PEG 400 de 4:1 (p/p).

5.3.3.- Reología de las microemulsiones múltiples o/a/o

5.3.3.1.- Influencia de la relación Brij® 96/PEG 400 sobre el comportamiento reológico de las microemulsiones múltiples o/a/o

En esta sección se evalúa el efecto producido por la variación de la relación Brij®/PEG 400 sobre la reología y la viscosidad de los sistemas dispersos objeto de estudio.

- Método:

Los ensayos se realizan sobre microemulsiones múltiples o/a/o con el mismo contenido en fase interna (microemulsión primaria o/a) (15% en peso), fase externa (60% en peso) y tensioactivo/cotensioactivo total (25% en peso), variándose únicamente la relación Brij® 96/PEG 400 entre 2:1 y 4:1.

Las medidas se realizan con un viscosímetro de disco rotatorio Brookfield modelo HB, dotado de un sistema informático de procesamiento de datos Rheocalc V1.1. El comportamiento reológico de las microemulsiones se evalúa mediante ciclos de “subida y bajada” con velocidades de giro de disco comprendidas entre 0 y 25 r.p.m. Se realizan 3 determinaciones por muestra para un total de 3 muestras (n=9).

- Resultados y comentarios:

La figura 65 muestra el comportamiento reológico de las microemulsiones múltiples o/a/o estudiadas a partir de la representación gráfica de la fuerza de cizalla realizada sobre el sistema, en función del intervalo de cizalla sobre el que se ejerce.

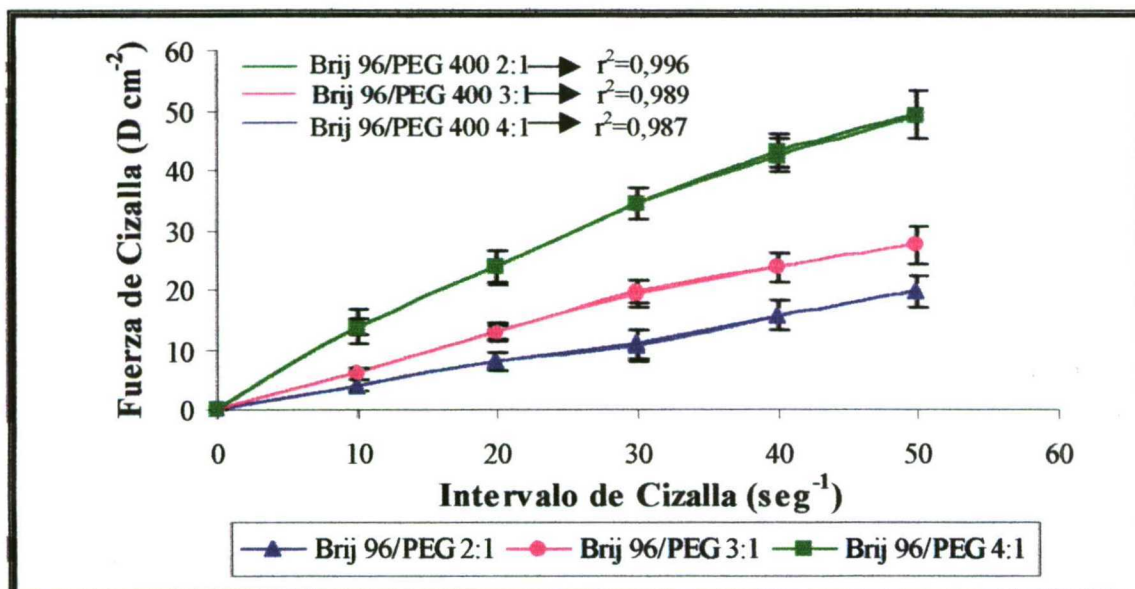


Figura 65. Comportamiento reológico de las microemulsiones múltiples o/a/o en función de la proporción Brij[®] 96/PEG 400.

Los sistemas dispersos estudiados presentan coeficientes de determinación muy próximos a la unidad ($\approx 0,99$), por lo que todos los sistemas estudiados se consideran como fluidos newtonianos. Por lo tanto, los valores de viscosidad se obtienen a partir de las pendientes de las rectas intervalo de cizalla/fuerza de cizalla para todos los sistemas dispersos.

A medida que aumenta la relación tensioactivo/cotensioactivo disminuye el coeficiente de determinación, aunque no muy significativamente, pudiéndose interpretar como una tendencia hacia comportamientos no newtonianos.

En la figura 66 se aprecian las variaciones en la viscosidad de las microemulsiones múltiples constituidas por microemulsión primaria (o/a)/ Brij[®] 96/PEG 400/IPM producidas por las distintas proporciones Brij[®] 96/PEG 400 estudiadas.

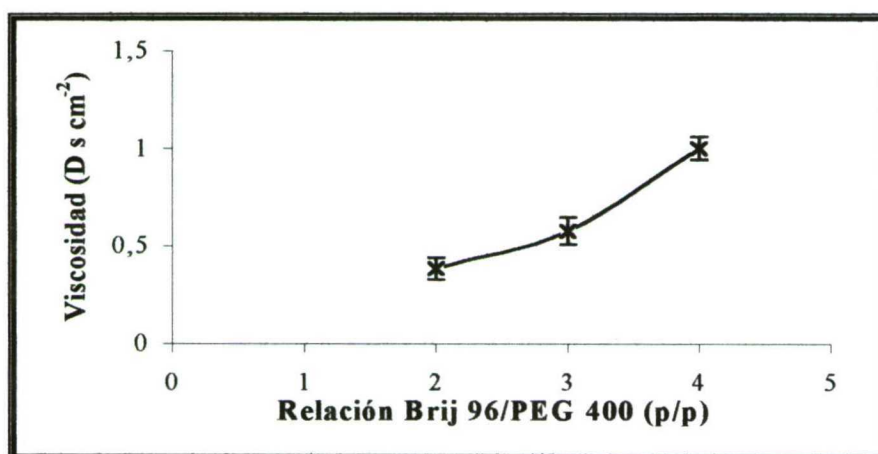


Figura 66. Influencia de la proporción Brij[®] 96/PEG 400 sobre la viscosidad de las microemulsiones múltiples o/a/o.

Los resultados obtenidos permiten afirmar que la viscosidad de las microemulsiones múltiples es un parámetro dependiente de la proporción Brij® 96/PEG 400, aumentando a medida que lo hace la relación tensioactivo/cotensioactivo (p/p).

5.3.3.2.-Influencia del contenido total en Brij® 96/PEG 400 sobre el comportamiento reológico de las microemulsiones múltiples o/a/o

En este apartado se evalúa el efecto producido por la variación del contenido total en tensioactivos sobre la reología y la viscosidad de los sistemas dispersos objeto de estudio.

- Método:

Los ensayos se realizan sobre microemulsiones múltiples o/a/o con el mismo contenido en fase interna (10% en peso) y una proporción variable de tensioactivo/cotensioactivo y, por tanto de fase acuosa, dentro del intervalo entre el 20- 50% en peso, con una relación Brij® 96/PEG 400 de 3:1 (p/p).

Las medidas se efectúan con el mismo equipo y las mismas condiciones empleadas en la sección anterior. Se realizan tres determinaciones por muestra para un total de 4 muestras (n=12).

- Resultados y comentarios:

La figura 67 muestra el comportamiento reológico de las microemulsiones múltiples o/a/o estudiadas a partir de la representación gráfica fuerza de cizalla/intervalo de cizalla.

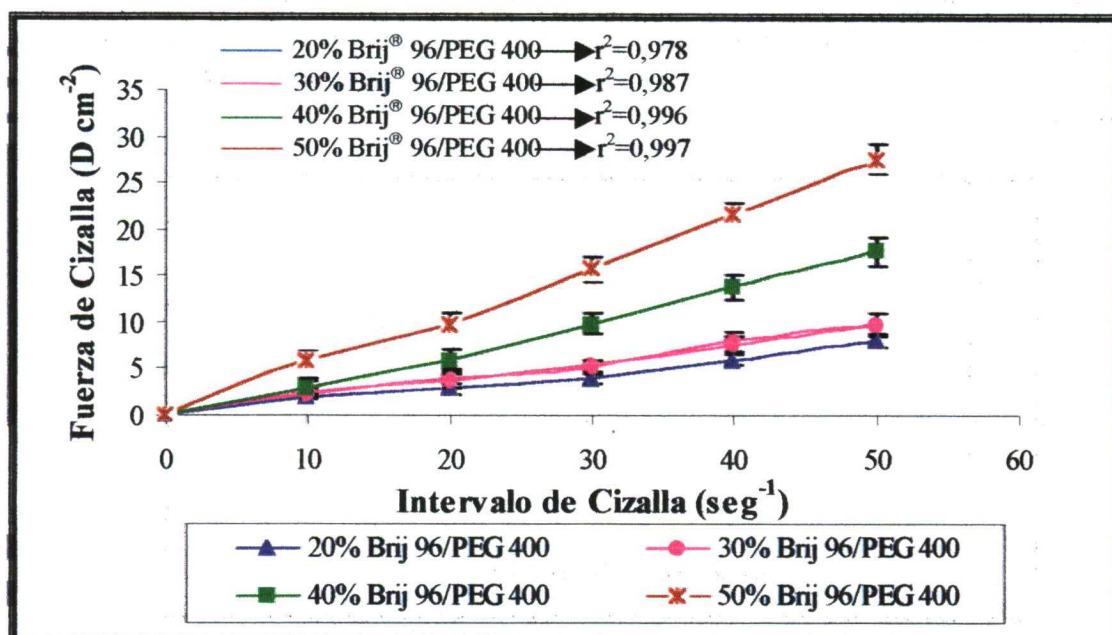


Figura 67. Comportamiento reológico de las microemulsiones múltiples o/a/o en función de su contenido total en tensioactivo/cotensioactivo.

Todas las microemulsiones múltiples o/a/o, excepto los sistemas que presentan un contenido en tensioactivo/cotensioactivo del 20%, demuestran tener un comportamiento newtoniano con valores de coeficiente de determinación próximos a la unidad. Los sistemas dispersos estudiados presentan un comportamiento newtoniano más definido a medida que aumenta el contenido total tensioactivo/cotensioactivo. Debido a las propiedades mencionadas, los valores de viscosidad se obtienen a partir de las pendientes de las rectas intervalo de cizalla/fuerza de cizalla para todos los sistemas dispersos a excepción del no newtoniano, donde el valor de dicho parámetro se calcula por el viscosímetro a la máxima velocidad de giro del disco (25 r.p.m.).

La figura 68 representa las variaciones en la viscosidad de los sistemas dispersos en función de su contenido total en tensioactivo/cotensioactivo. Los resultados obtenidos permiten afirmar que la viscosidad de las microemulsiones múltiples estudiadas es un parámetro dependiente del contenido total de Brij® 96/PEG 400 de las mismas. La viscosidad de los sistemas dispersos aumenta a medida que lo hace el contenido total tensioactivo/cotensioactivo. A partir del 30% se aprecia un incremento de la viscosidad proporcional al contenido total de tensioactivo/cotensioactivo.

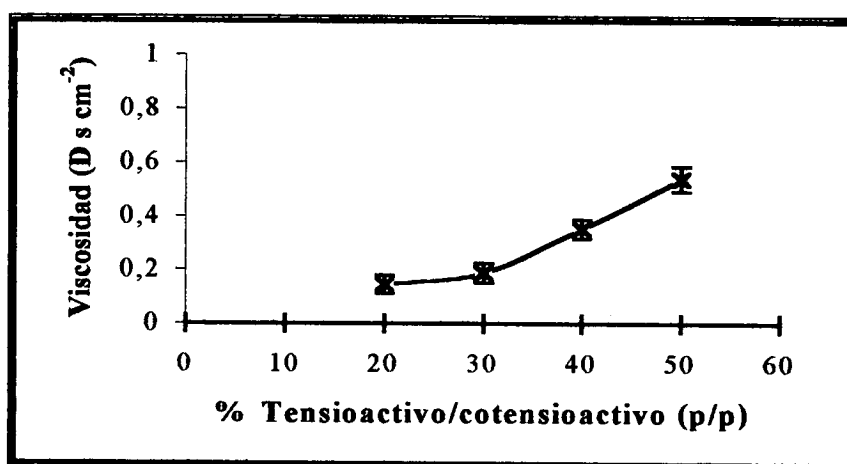


Figura 68. Influencia del contenido total en tensioactivo/cotensioactivo sobre la viscosidad de las microemulsiones múltiples o/a/o.

5.3.3.3.- Influencia del contenido en fase interna sobre el comportamiento reológico de las microemulsiones múltiples o/a/o

En esta sección se evalúa el efecto producido por la variación del contenido en fase interna (microemulsión primaria o/a) sobre la reología y la viscosidad de los sistemas dispersos objeto de nuestro estudio.

- Método:

Los ensayos se realizan sobre microemulsiones que presentan el mismo contenido en Brij® 96/PEG 400 (30%) a una relación fija (3:1, p/p) y una proporción variable de fase interna dentro del intervalo comprendido entre el 10 y el 20% en peso. Las medidas se efectúan con el mismo equipo y las mismas condiciones empleadas en los aparatos anteriores.

Se realizan 3 determinaciones por muestra para un total de 3 muestras ($n=9$).

- Resultados y comentarios:

La figura 69 muestra el comportamiento reológico de las microemulsiones múltiples estudiadas a partir de la representación gráfica fuerza de cizalla/intervalo de cizalla. Todos los sistemas estudiados presentan un comportamiento claramente newtoniano, presentando valores de coeficiente de determinación próximos a la unidad. Para todas las microemulsiones múltiples el valor de la viscosidad se determina a partir de la pendiente de la recta intervalo/fuerza de cizalla.

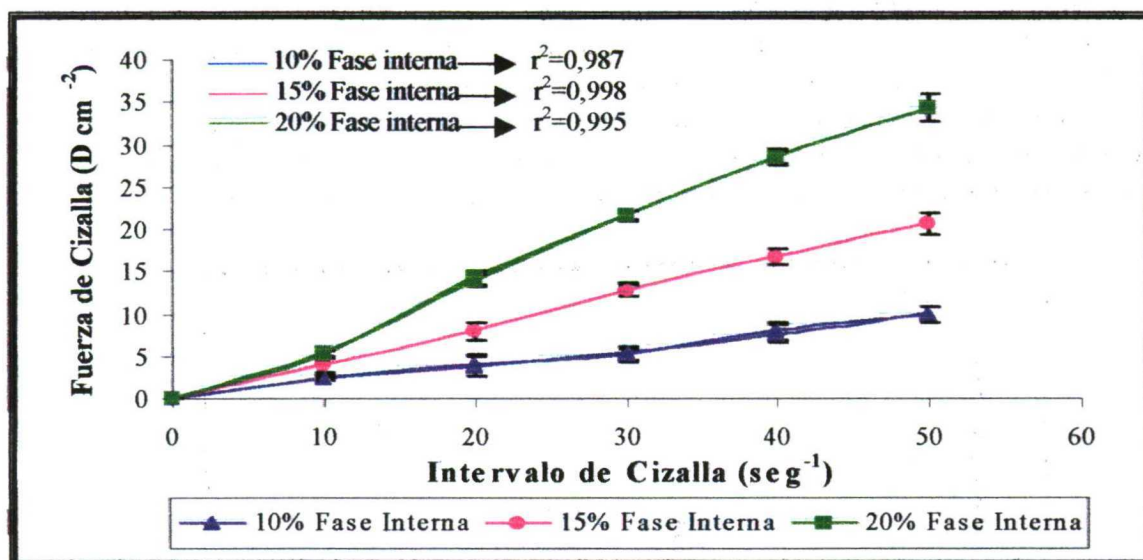


Figura 69. Comportamiento reológico de las microemulsiones múltiples en función de su contenido en fase interna (microemulsión o/a).

La figura 70 representa las variaciones en la viscosidad de las microemulsiones múltiples en función de su contenido en fase interna.

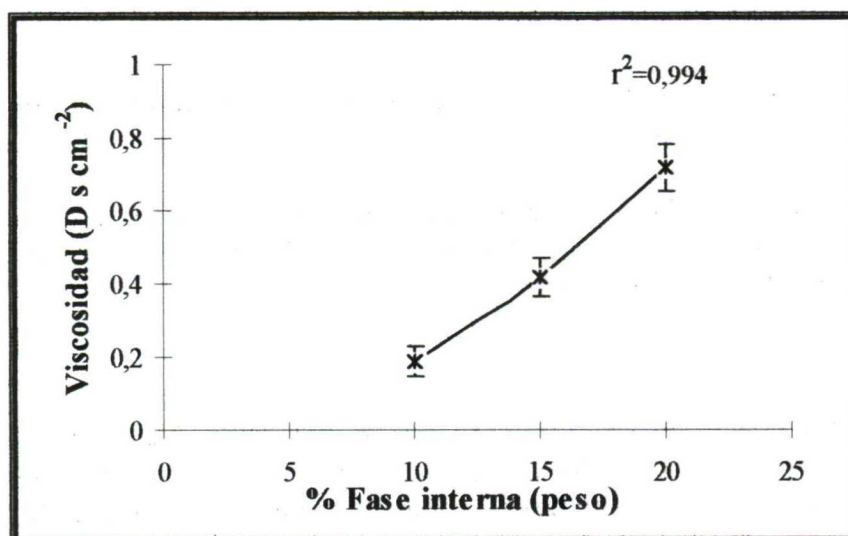


Figura 70. Influencia del contenido en fase interna (microemulsión primaria o/a) sobre la viscosidad de las microemulsiones múltiples.

La viscosidad de las microemulsiones múltiples estudiadas se encuentra significativamente influenciada por la proporción de fase interna presente en las mismas, incrementándose el valor de dicho parámetro proporcionalmente al aumentar su contenido en fase dispersa.

5.3.4.- Estudio del tamaño de gotícula de la fase interna de las microemulsiones múltiples o/a/o

5.3.4.1.- Influencia de la relación Brij®96/PEG 400 sobre el tamaño de gotícula de las microemulsiones múltiples o/a/o

El objetivo de este estudio es evaluar las variaciones en los radios hidrodinámicos (R_h) de las gotículas que constituyen la fase interna de las microemulsiones múltiples, en función de la relación en peso del tensioactivo y cotensioactivo presentes en las mismas.

- Método:

Los ensayos se realizan sobre microemulsiones múltiples con el mismo contenido en fase interna (15% en peso de microemulsión primaria o/a), tensioactivo/cotensioactivo total (25% en peso) y fase externa (65% en peso de IPM), variándose únicamente la relación Brij® 96/PEG 400 dentro del intervalo comprendido entre 2:1 y 4:1. La determinación de los radios hidrodinámicos de las gotículas de la fase interna que constituyen las microemulsiones múltiples se realiza por PCS. El equipo y las condiciones empleadas durante la medida de las muestras, así como el tratamiento de los datos obtenidos se han explicado detalladamente en el apartado 5.1.9.1. Se preparan las muestras por duplicado y se realizan 3 determinaciones por muestra.

- Resultados y comentarios:

La figura 71 representa las variaciones en el radio hidrodinámico (R_h) de las gotículas de la fase interna de las microemulsiones múltiples en función de la relación Brij® 96/PEG 400 presente en las mismas.

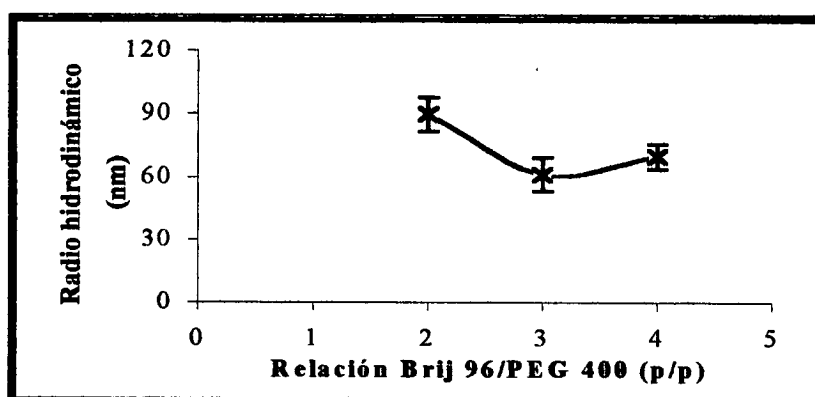


Figura 71. Influencia de la relación Brij®96/PEG 400 sobre el tamaño de gotícula de las microemulsiones múltiples.

La relación Brij®96/PEG 400 ejerce cierta influencia en el tamaño de gotícula, observándose una disminución en dicho parámetro al pasar de la relación tensioactivo/cotensioactivo 2:1 a 3:1, para incrementar posteriormente el radio hidrodinámico con la proporción 4:1.

Los resultados obtenidos demuestran la contribución eficaz del PEG 400 como cotensioactivo en la relación Brij®96/PEG 400 3:1 para reducir del tamaño de gotícula de las microemulsiones múltiples estudiadas. Este hecho podría explicar que esta relación tensioactivo/cotensioactivo origine la mayor área de formación de microemulsiones múltiples (apartado 5.2.2.2).

5.3.4.2.- *Influencia del contenido total Brij® 96/propilenglicol sobre el tamaño de gotícula de las microemulsiones múltiples o/a/o*

En esta sección se evalúa el efecto producido por la variación del contenido total tensioactivo/cotensioactivo sobre el radio hidrodinámico de las gotículas que constituyen la fase dispersa de las microemulsiones múltiples estudiadas.

- Método:

Los ensayos se realizan sobre microemulsiones múltiples con el mismo contenido en fase interna (10% en peso) y una porcentaje variable tensioactivo/cotensioactivo dentro del intervalo comprendido entre el 20 y el 50% en peso, a una relación fija Brij®96/PEG 400 correspondiente a 3:1 (p/p). El equipo y las condiciones empleadas durante la medida de las muestras, así como el tratamiento de los datos obtenidos se han explicado detalladamente en el apartado 5.1.9.1. Se preparan las muestras por duplicado y se realizan 3 determinaciones por muestra.

- Resultados y comentarios:

La figura 72 representa las variaciones en el radio hidrodinámico de las gotículas de la fase interna de las múltiples microemulsiones o/a/o, en función del contenido total tensioactivo/cotensioactivo.

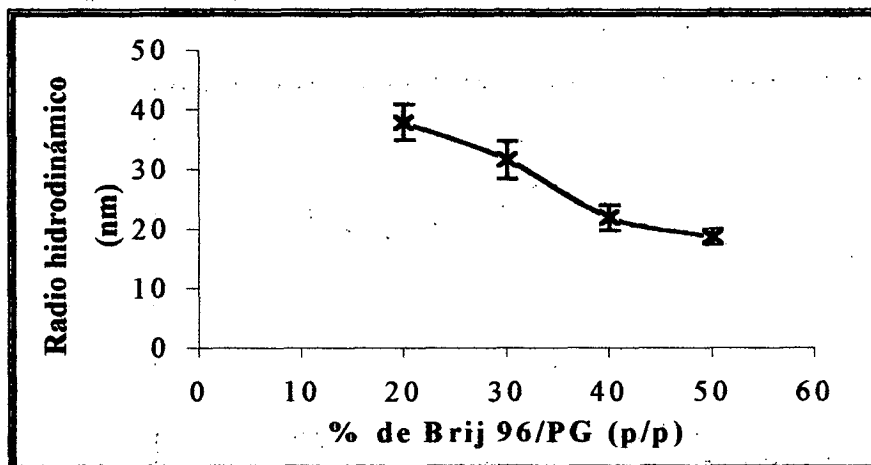


Figura 72. *Influencia del contenido total Brij®96/PEG 400 sobre el tamaño de gotícula de las microemulsiones múltiples.*

El tamaño de gotícula de la fase interna de las microemulsiones múltiples o/a/o es dependiente del contenido total Brij[®]96/PEG 400. Así, se observa que el radio hidrodinámico de las gotículas que constituyen la fase dispersa de las microemulsiones múltiples o/a/o disminuye a medida que aumenta el contenido total tensioactivo/cotensioactivo.

5.3.4.3.- Influencia del contenido en fase interna sobre el tamaño de gotícula de las microemulsiones múltiples o/a/o

En este apartado se evalúa el efecto producido por la variación del contenido en fase interna (microemulsión primaria o/a) sobre el tamaño de gotícula de la fase interna de los sistemas dispersos objeto de estudio.

- Método:

Los ensayos se realizan sobre microemulsiones múltiples que presentan el mismo contenido en tensioactivo/cotensioactivo (30% en peso) a una relación fija 2:1 (p/p) y una proporción variable de fase oleosa dentro del intervalo comprendido entre el 5 y el 20% en peso.

El equipo y las condiciones empleadas durante la medida de las muestras, así como el tratamiento de los datos obtenidos se han explicado detalladamente en el apartado 5.1.9.1.

Se preparan las muestras por duplicado y se realizan 3 determinaciones por muestra.

- Resultados y comentarios:

La figura 73 representa las variaciones en el radio hidrodinámico de las gotículas de las microemulsiones múltiples, en función de su contenido en fase interna.

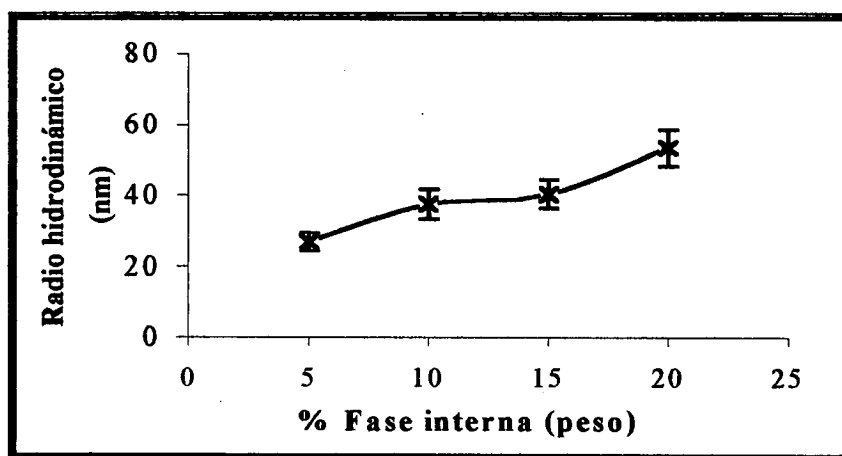


Figura 73. Influencia del contenido en fase interna sobre el tamaño de gotícula de las microemulsiones múltiples.

El radio hidrodinámico (R_h) de gotícula de las microemulsiones múltiples estudiadas se incrementa a medida que lo hace el porcentaje de fase interna (microemulsión primaria o/a) incorporado. El aumento del valor de este parámetro se produce de manera más acusada para los intervalos de fase interna comprendidos entre el 5-10% y el 20-25%.

5.3.5.- Incorporación de nifedipino en la microemulsión múltiple o/a/o

Para la incorporación del principio activo se selecciona la microemulsión múltiple o/a/o con mayor contenido en fase interna (20% de microemulsión primaria (o/a) Brij®96/PG, 2:1 p/p), menor proporción de tensioactivo/cotensioactivo necesaria para su formación, que es del 30% para una relación Brij®96/PEG 400 3:1 y un 50% de fase externa (IPM). La incorporación del principio activo se realiza tanto en la fase interna (microemulsión primaria o/a) como en la fase externa (IPM) con el fin de producir una dosis de ataque que permita disminuir el tiempo de latencia. Este parámetro constituye el principal factor limitante durante la absorción de un fármaco cuando se administra por vía transdérmica.

La concentración de nifedipino presente en 10 ml de microemulsión múltiple o/a/o (20% microemulsión primaria (o/a)/30% Brij®96/PEG 400/50% IPM) es de $1,12 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, teniendo en cuenta que la máxima cantidad de nifedipino incorporada en la microemulsión primaria o/a es de $5,61 \pm 0,19 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (apartado 5.1.7.5.). Sin embargo, esta cantidad es insuficiente para la desarrollo de un sistema de liberación controlada que permita su aplicación en un área razonable ($10\text{-}30 \text{ cm}^2$) con el fin de alcanzar niveles terapéuticos eficaces (Diez y cols. 1991 y Ruan y cols. 1992). Según los estudios realizados por estos autores con el nifedipino y el nitrendipino, la dosis adecuada para la administración transdérmica de estos principios activos durante 48 horas es de 40 mg aproximadamente.

5.3.5.1.- Incremento de la cantidad incorporada de nifedipino en la fase interna de la microemulsión múltiple o/a/o

Para conseguir incorporar las cantidades necesarias de nifedipino en la microemulsión primaria o/a ($18 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) para el desarrollo galénico de las microemulsiones múltiples o/a/o con una dosis de 40 mg/10 ml de microemulsión múltiple o/a/o se selecciona como solvente la DMA. Los motivos para la utilización de este solvente son:

1) Los excelentes resultados obtenidos en los estudios realizados por El-Sayed y Repta (1983) en los que consiguieron incrementar la solubilidad y la estabilidad de un agente anticancerígeno, mediante la utilización de dimetilacetamida (DMA) a distintos porcentajes (1-5%). Mediante el empleo de este solvente lograron incorporar este principio activo dentro de una emulsión o/a, disponible comercialmente (Intralipid), destinada a la administración parenteral.

2) Elevada solubilidad del nifedipino en dimetilacetamida ($175,60 \pm 0,17 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$).

- Método:

Para incrementar la solubilidad de nifedipino en la fase interna de las microemulsiones o/a, constituidas por IPM/Brij® 96/propilenglicol/agua (15/30/55; p/p/p), se procede a la incorporación a este sistema de concentraciones de DMA comprendidas entre el 1 y el 4%, previa sustitución de idéntico porcentaje de IPM al incorporado de DMA. De esta manera se intenta minimizar al máximo cambios en la formulación.

Para determinar la máxima cantidad de nifedipino incorporado al sistema disperso, se adicionan a las distintas mezclas IPM(14%-11%)/DMA(1-4%) cantidades crecientes de principio activo correspondientes a unas concentraciones teóricas de 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0 y 30,0 mg·ml⁻¹. Una vez dispersado el nifedipino en las mezclas mencionadas, se adiciona Brij® 96/propilenglicol (30%) y posteriormente la fase acuosa manteniéndose el sistema en agitación hasta la formación de la microemulsión. A continuación, se filtran las microemulsiones o/a obtenidas a través de filtros de celulosa de 0,45 µm de tamaño de poro para eliminar el nifedipino en suspensión y por lo tanto no incorporado al sistema disperso.

La cuantificación del principio activo presente en los distintas microemulsiones o/a se realiza por HPLC, previa disolución de las microemulsiones obtenidas en metanol hasta obtener una concentración teórica de nifedipino en solución de 20 µg·ml⁻¹. El número de muestras estudiadas por concentración es de tres (n=18), y los análisis de cada muestra se realizan por triplicado.

- Resultados y comentarios:

La tabla 27 muestra las cantidades máximas incorporadas de nifedipino en las distintas microemulsiones IPM/Brij® 96/propilenglicol/agua a las que se incorporan en la fase interna porcentajes de DMA comprendidos entre 1-4%, previa sustitución de idénticos porcentajes de IPM.

<i>Cantidad de nifedipino solubilizado en la microemulsión o/a en función del % incorporado de DMA en la fase interna (IPM)</i>				
<i>IPM/DMA (%)</i>	<i>14/1</i>	<i>13/2</i>	<i>12/3</i>	<i>11/4</i>
Nifedipino incorporado (mg/ml)	8,89±0,38	15,09±0,59	19,61±0,51	25,67±0,47

Tabla 27. Cantidad máxima de nifedipino solubilizado en las microemulsiones o/a (IPM/Brij® 96/propilenglicol/ agua) mediante la incorporación en la fase interna de distintos porcentajes de DMA.

La incorporación de un 3% de DMA, previa sustitución del mismo porcentaje de fase oleosa, permite solubilizar en la fase interna una concentración de nifedipino de 19,61±0,51 mg·ml⁻¹. Por lo tanto, la microemulsión o/a con un 15% (p/p) de fase interna constituida por IPM/DMA a una relación 4:1 es capaz de incorporar los 18 mg·ml⁻¹ necesarios para obtener microemulsiones múltiples o/a/o (microemulsión primaria (o/a)/Brij® 96/PEG 400/IPM ; 20/30/50; p/p/p) con una dosis de 40 mg (36 mg en fase interna y 4 mg en la fase externa (IPM)).

5.3.5.2.- Caracterización de la microemulsión primaria o/a constituida por IPM/DMA (4:1), Brij® 96, propilenglicol y agua

5.3.5.2.1.-Aspecto y color

- Método:

La caracterización de las propiedades organolépticas se lleva a cabo por la observación directa de la microemulsión recién elaborada.

- Resultados y comentarios:

Las microemulsiones obtenidas presentan un aspecto homogéneo transparente, sin partículas en suspensión o precipitadas, resultando ser isotropas ópticamente al evaluar su comportamiento frente a la luz polarizada mediante prismas de Nicols. Además, se observa una coloración amarillenta cuando el nifedipino se incorpora a la microemulsión siendo transparente e incolora en su ausencia.

Los ensayos de dilución con agua y solubilización con un colorante acuoso (naranja de metilo) confirman que la incorporación de nifedipino no modificó el signo de la microemulsión.

5.3.5.2.2.- Reología y viscosidad de las microemulsiones primarias o/a (IPM/DMA (4:1)/ Brij® 96/ propilenglicol/agua) con nifedipino

A continuación se describen los estudios realizados sobre el comportamiento reológico y viscosidad de las microemulsiones o/a cargadas con nifedipino, constituidas por 15% fase interna (IPM/DMA a una proporción 4:1), 30% Brij® 96/ propilenglicol y 55% agua. Los resultados obtenidos se comparan con los observados al determinar dichas propiedades en las microemulsiones sin nifedipino y con IPM como fase interna.

- Método:

La viscosidad de los distintos sistemas dispersos se determina a 25°C, mediante el empleo del mismo equipo y las mismas condiciones utilizadas en estudios de este tipo realizados en apartados anteriores.

- Resultados y comentarios:

La figura 74 representa las gráficas fuerza/intervalo de cizalla de las microemulsiones primarias o/a con y sin nifedipino.

Las microemulsiones o/a cargadas con ó sin nifedipino presentan perfiles prácticamente solapables. Los coeficientes de determinación para ambas microemulsiones son muy parecidos y próximos a la unidad ($>0,99$), indicando el comportamiento claramente newtoniano de las mismas. Por lo tanto, la viscosidad de los dos sistemas dispersos se determina mediante el valor de la pendiente de la recta.

fuerza de cizalla/intervalo de cizalla. Los valores de viscosidad obtenidos son de $1,41 \pm 0,027$ y $1,44 \pm 0,019$ D·s·cm⁻² para las microemulsiones con y sin nifedipino, respectivamente.

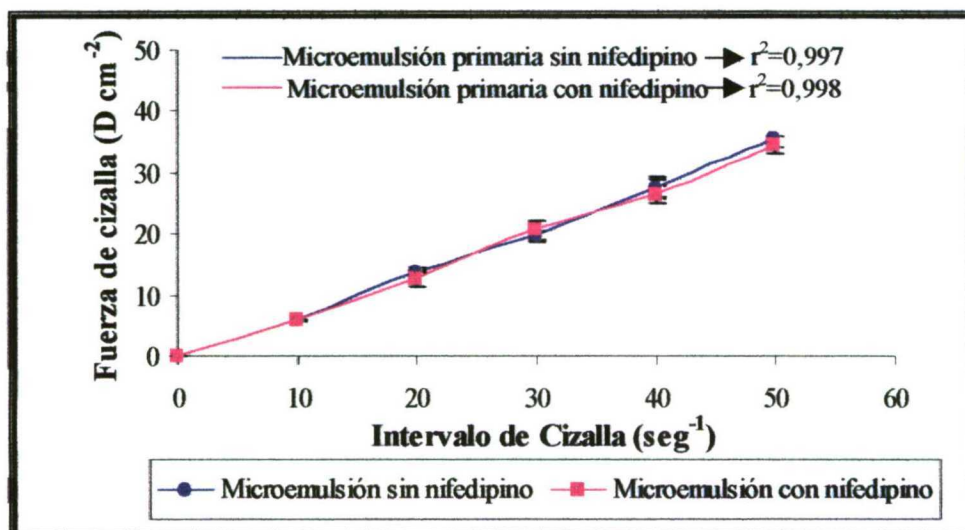


Figura 74. Comportamiento reológico de las microemulsiones primarias con y sin nifedipino

A la vista de los resultados se puede concluir que la incorporación de grandes cantidades de nifedipino ($18 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) en la microemulsión primaria o/a, mediante el empleo de la fase interna (15% en peso) constituida por IPM/DMA (4:1), no ejerce modificaciones en el comportamiento reológico y viscosidad de la misma.

5.3.5.2.3.- Tamaño de gotícula de las microemulsiones primarias o/a (IPM/DMA (4:1)/ Brij® 96/ propilenglicol/agua) con nifedipino

- Método:

La determinación de los radios hidrodinámicos de las gotículas que constituyen la fase dispersa de las microemulsiones o/a cargadas con nifedipino constituidas por 15% fase interna (IPM/DMA a una proporción 4:1), 30% Brij® 96/ propilenglicol y 55% agua, se realiza por PCS. Se emplea el mismo equipo y las mismas condiciones que se han utilizado en estudios de este tipo realizados en apartados anteriores de este capítulo. Los resultados obtenidos se comparan con los observados al determinar este parámetro en las microemulsiones o/a sin nifedipino y con IPM como fase interna.

El tratamiento de los datos para la determinación del radio hidrodinámico se ha explicado de manera detallada en el apartado 5.1.9.1.

- Resultados y comentarios:

La figura 75 muestra la función de distribución de tiempos de relajación, para un ángulo de 90° y una probabilidad de rechazo de 0,5, de las microemulsiones primarias o/a cargadas con y sin nifedipino. Las velocidades de decaimiento o inversos del tiempo

de relajación (Γ en μs^{-1}) se obtienen a partir de los máximos de la función de distribución.

Las funciones de distribución de las microemulsiones o/a cargadas con nifedipino y sin nifedipino se caracterizan por presentar dos máximos. En ambos casos los inversos de los tiempos de relajación correspondientes a los dos máximos de la función de distribución varían significativamente lo que indica la existencia de dos poblaciones con radios hidrodinámicos diferentes.

Si comparamos las funciones de distribución de los sistemas dispersos con y sin nifedipino podemos concluir que los inversos de los tiempos de relajación correspondientes a cada máximo son diferentes, por lo que el radio hidrodinámico medio de los sistemas dispersos con y sin nifedipino es totalmente distinto.

Para la microemulsión sin nifedipino, los radios hidrodinámicos obtenidos a partir de los inversos del tiempo de relajación para cada máximo son de 13,6 y 33,7 nm, y la contribución de cada máximo al total es de 76,6 y 23,4%, respectivamente. El radio hidrodinámico medio de gotícula es de 23,4 nm.

Para la microemulsión cargadas con nifedipino los radios hidrodinámicos obtenidos a partir del tiempo de relajación para cada máximo son de 29,7 y 72,5 nm y la contribución de cada máximo al total es de 69,8 y 30,2% respectivamente. El radio hidrodinámico medio de gotícula es de 51,1 nm.

A la vista de los resultados podemos concluir que la incorporación de nifedipino en la microemulsión o/a provoca un incremento en el radio hidrodinámico medio de las gotículas de la fase interna de la microemulsión o/a.

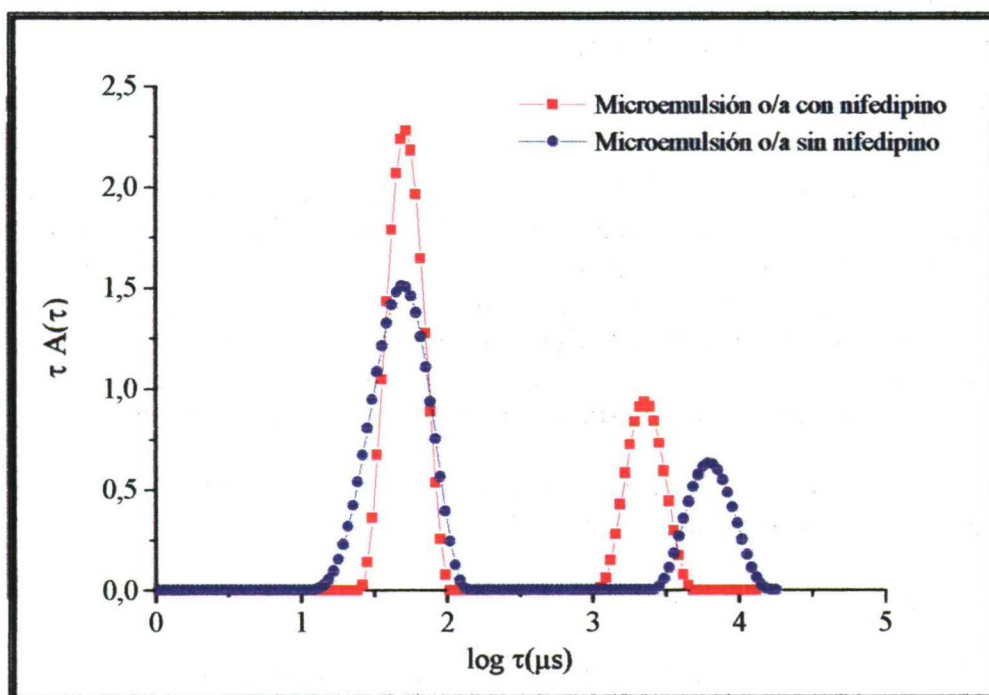


Figura 75. Funciones de distribución de los tiempos de relajación para las microemulsiones primarias o/a con y sin nifedipino

5.3.5.2.4.-Determinación del pH en las microemulsiones primarias o/a (IPM/DMA (4:1)/ Brij® 96/ propilenglicol/agua) con nifedipino

- Método:

El pH de los sistemas dispersos se determina con un pHmetro Crison microPH 2002. El número de determinaciones por muestra es de 4 (n=4).

- Resultados y comentarios:

El valor medio de pH obtenido en las determinaciones realizadas es de $5,61 \pm 0,08$, siendo muy similar este valor al obtenido para la microemulsión sin nifedipino ($5,59 \pm 0,04$).

5.3.5.3.- Incorporación de nifedipino en la fase externa (IPM) de la microemulsión múltiple o/a/o

Como se ha comentado anteriormente, la incorporación de nifedipino a la fase externa de la microemulsión múltiple seleccionada, se realiza con el fin de reducir el tiempo de latencia observado por nuestro grupo de investigación en microemulsiones simples (o/a) al realizar los ensayos de cesión in vitro a través de membranas artificiales (Moreno y cols., 2000).

- Método:

Debido a la lipofilia de la molécula objeto de estudio, se plantea el desarrollo de microemulsiones múltiples de fase externa oleosa con el fin de poder incorporar el nifedipino en la misma y reducir el tiempo de latencia en los ensayos de cesión. Así, el principio activo no tiene que difundir desde la fase interna oleosa a la externa del sistema disperso para que ceda a través de la membrana.

La cantidad de nifedipino que se incorpora a la fase externa es de $0,8 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, de este modo la cantidad de nifedipino presente en 10 ml de microemulsión múltiple o/a/o será de 40 mg.

Para la obtención de la solución de IPM con una concentración de $0,8 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ de principio activo, se adiciona 8 mg de nifedipino en 10 ml de IPM, agitando primero la solución mecánicamente con vórtex durante 5 minutos y posteriormente se introduce en baño de ultrasonidos durante 10 minutos hasta completa disolución. De esta solución se toman 5 ml para el desarrollo de la microemulsión múltiple.

- Resultados y comentarios:

La solución de IPM con una concentración de $0,8 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ de nifedipino es límpida transparente y de color amarillento. Además, la solución mantiene las mismas características durante 48 horas no observándose precipitación del nifedipino.

5.3.6.- Caracterización de las microemulsiones múltiples o/a/o constituidas por microemulsión primaria (o/a)/Brij®96/PEG 400/IPM (20/30/50; p/p/p) con nifedipino incorporado en la fase interna y externa

5.3.6.1.-Aspecto y color

- Método:

La caracterización de las propiedades organolépticas se lleva a cabo por la observación directa de la microemulsión recién elaborada.

- Resultados y comentarios:

Las microemulsiones obtenidas presentan un aspecto homogéneo transparente, sin partículas en suspensión o precipitadas, resultando ser isotropas ópticamente al evaluar su comportamiento frente a la luz polarizada mediante prismas de Nicols. Además, se observa una coloración amarillenta cuando el nifedipino se incorpora a la microemulsión múltiple, siendo transparente e incolora en su ausencia.

Se confirma mediante los ensayos de dilución con IPM y de solubilización con un colorante liposoluble (Sudán III) que la incorporación de nifedipino no modifica el signo de la microemulsión.

5.3.6.2.- Reología y viscosidad de las microemulsiones múltiples o/a/o

A continuación se describen los estudios realizados sobre el comportamiento reológico y viscosidad de la microemulsión múltiple (microemulsión primaria (o/a)/Brij®96/PEG 400/IPM) cargada con principio activo. Los resultados obtenidos se comparan con los observados al determinar dichas propiedades en el mismo sistema disperso sin nifedipino.

- Método:

La viscosidad de los distintos sistemas se determina a 25°C con el mismo equipo y las mismas condiciones empleadas en estudios similares realizados en apartados anteriores.

- Resultados y comentarios:

La figura 76 representa las gráficas fuerza/intervalo de cizalla de las microemulsiones múltiples constituidas por microemulsión primaria (o/a)/Brij®96/PEG 400/IPM con y sin nifedipino.

Las microemulsiones múltiples o/a/o (microemulsión primaria (o/a)/Brij®96/PEG 400/IPM) en presencia y ausencia de nifedipino presentan perfiles prácticamente solapables. Los coeficientes de determinación para ambas sistemas dispersos presentan valores similares y próximos a la unidad (>0,99), indicando el comportamiento

claramente newtoniano de las mismas. La viscosidad de ambos sistemas dispersos se determina mediante el valor de la pendiente de la recta fuerza de cizalla/intervalo de cizalla. Los valores de viscosidad son de $0,76 \pm 0,057$ y $0,73 \pm 0,049$ D·s·cm⁻² para las microemulsiones múltiples o/a/o con y sin principio activo, respectivamente.

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que la incorporación de nifedipino en la fase interna (microemulsión primaria o/a) y externa (IPM) no modifica el comportamiento reológico ni la viscosidad del sistema disperso.

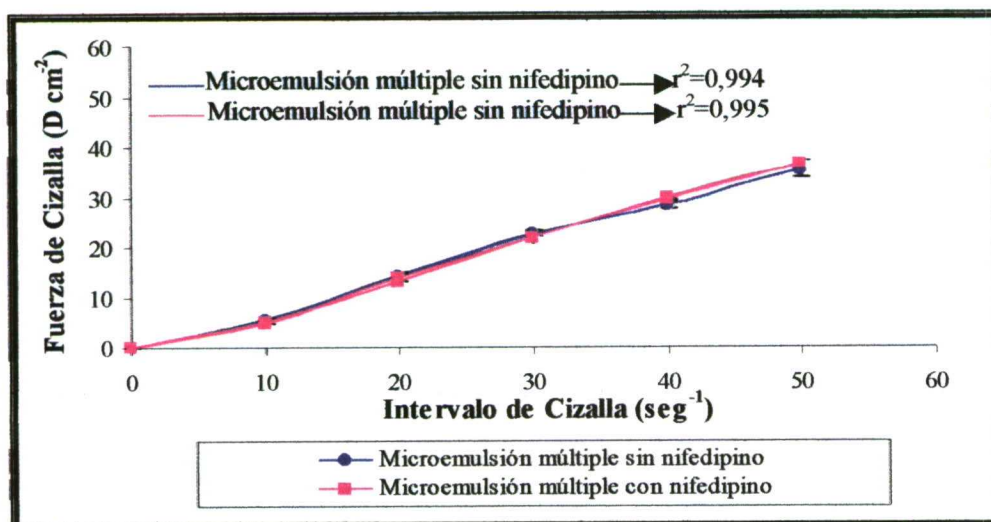


Figura 76. Comportamiento reológico de las microemulsiones múltiples o/a/o (microemulsión primaria (o/a)/Brij[®]96/PEG 400/IPM) con y sin nifedipino.

5.3.6.3.- Tamaño de gotícula de las microemulsiones múltiples o/a/o

- Método:

La determinación de los radios hidrodinámicos de las gotículas constituyentes de la fase dispersa de las microemulsiones múltiples o/a/o con nifedipino se realiza por PCS. Se utiliza el mismo equipo y las mismas condiciones empleadas para estudios de este tipo realizados en apartados anteriores. Se preparan las muestras por duplicado y se realizan 3 determinaciones por muestra.

- Resultados y comentarios:

La figura 77 muestra la función de distribución de tiempos de relajación de las microemulsiones múltiples o/a/o constituidas por microemulsión primaria o/a/Brij[®]96PEG 400/IPM cargadas con y sin nifedipino.

Las funciones de distribución se obtienen a un ángulo de 90° y una probabilidad de rechazo de 0,5. Las velocidades de decaimiento o inversos del tiempo de relajación (Γ en μ s⁻¹) se obtienen a partir de los máximos de la función de distribución.

Las funciones de distribución de los tiempos de relajación para las microemulsiones múltiples cargadas con nifedipino y sin nifedipino se caracterizan por tener tres máximos (A, B y C). En cada función de distribución cada máximo indica la existencia una población con radios hidrodinámicos muy diferenciados al presentar distintos inversos del tiempo de relajación.

Si comparamos las funciones de distribución de las microemulsiones múltiples o/a/o con y sin nifedipino se puede observar que superponen casi completamente. Sin embargo, se observa una disminución del máximo B de la función de distribución de la microemulsión múltiple con nifedipino, respecto al sistema disperso sin nifedipino y una disminución del máximo C de la función de distribución de la microemulsión múltiple sin nifedipino, respecto al sistema disperso con nifedipino.

Por lo tanto, existen diferencias entre los inversos de los tiempos de relajación de los máximos B y C de la función de distribución de la microemulsión múltiple con nifedipino y los mismos máximos de la función de distribución de la microemulsión múltiple con nifedipino, lo que podría dar lugar a poblaciones de radios hidrodinámicos distintos.

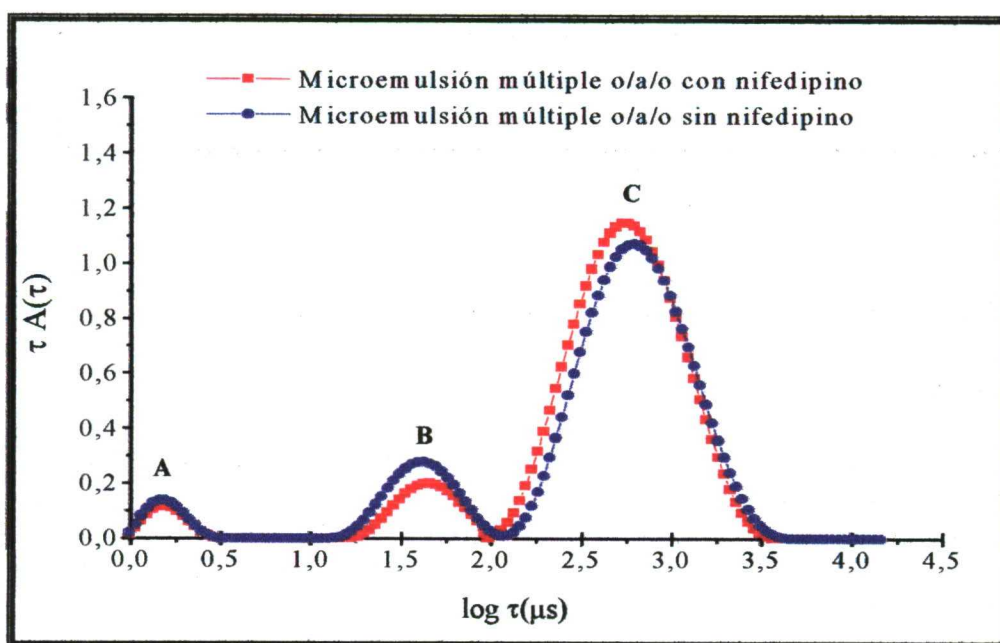


Figura 77. Funciones de distribución de los tiempos de relajación para las múltiple o/a/o constituida por microemulsión primaria o/a/Brij® 96PEG 400/IPM en presencia y ausencia de nifedipino.

Para la múltiple microemulsión sin nifedipino, los radios hidrodinámicos obtenidos a partir de los inversos del tiempo de relajación para cada máximo son de $9,7 \pm 1,4 \text{ \AA}$, $15,7 \pm 2,7 \text{ nm}$ y $167,6 \pm 14,5 \text{ nm}$ y la contribución de cada máximo al total es del 4,5, 13,7 y 78,4%, respectivamente. El radio hidrodinámico medio de gotícula es de $61,5 \pm 4,3 \text{ nm}$. Mientras que para la microemulsión cargadas con nifedipino, los radios hidrodinámicos obtenidos a partir del tiempo de relajación para cada máximo son de $9,6 \pm 0,9 \text{ \AA}$, $18,4 \pm 3,2 \text{ nm}$ y $154,3 \pm 12,6 \text{ nm}$, y la contribución de cada máximo al total del 3,93, 9,4 y 86,7%, respectivamente. El radio hidrodinámico medio de gotícula es de

57,9 ± 2,7 nm. Por lo tanto, a la vista de los datos obtenidos y después de realizar un análisis estadístico multifactorial (ANOVA) para una $P < 0,05$ y un intervalo de confianza del 95%, se puede concluir que, al incorporar nifedipino en la fase interna (microemulsión primaria) y externa (IPM) no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los radios hidrodinámicos de las poblaciones, correspondientes a los máximos A, B y C de las funciones de distribución, de ambos sistemas dispersos.

Tampoco, se observan diferencias significativas, al realizar el mismo análisis estadístico, en el radio hidrodinámico medio de las microemulsiones múltiples o/a/o con y sin nifedipino.

5.3.6.4.-Determinación del pH en las microemulsiones múltiples o/a/o

- Método:

El pH de los sistemas dispersos es determinado con un pHmetro Crison microPH 2002. El número de determinaciones por muestra es de 4 ($n=4$).

- Resultados y comentarios:

El valor medio de pH obtenido en las determinaciones realizadas es de $6,84 \pm 0,04$, siendo muy similar este valor al obtenido para la microemulsión sin nifedipino $6,78 \pm 0,02$.

5.3.7.- Estabilidad de las microemulsiones múltiples o/a/o frente a la temperatura y la humedad

Los estudios de estabilidad tienen como finalidad la determinación de las condiciones óptimas de conservación de estas microemulsiones múltiples o/a/o de nifedipino.

- Método:

Se disponen muestras de microemulsiones múltiples cargadas con nifedipino en viales cerrados de vidrio protegidos de la luz.

Las muestras son sometidas durante 6 meses a las siguientes condiciones:

- Temperatura 4°C y 60% de humedad relativa (HR).
- Temperatura 25°C.
- Temperatura 30°C y 60% humedad relativa (HR).
- Temperatura 40°C y 75% humedad relativa (HR).

Se toman muestras a tiempo 0 y a los 1, 3 y 6 meses, sobre las que se evalúan los siguientes parámetros.

1.- Estabilidad química:

Se preparan soluciones metanólicas de las muestras tomadas a los distintos tiempos con una concentración de 10 µg/ml, que se filtran por 0,45 µm y valoran respecto a su contenido de nifedipino (n=3), por HPLC. El contenido en principio activo debe estar comprendido entre 90-110%.

2.- Estabilidad física:

a) *Aspecto y propiedades organolépticas de las microemulsiones múltiples o/a/o:* se evalúan los cambios en el aspecto, color y olor de las muestras tomadas a los distintos tiempos comparándolas con la muestra estudiada al comienzo del estudio. Las muestras se consideran estables siempre que presentan aspecto, color y olor característico.

b) *pH:* se evalúan los cambios de pH de las microemulsiones múltiples o/a/o a cada tiempo de toma de muestra mediante el empleo de un pHmetro Crison micro pH 2002.

c) *Tamaño de gotícula de la fase interna (Ø):* se determina el tamaño de las gotículas constituyentes de la fase interna (microemulsión primaria o/a) de las muestras tomadas a distintos tiempos mediante PCS siguiendo la misma metodología que en secciones anteriores. Las muestras se consideran estables siempre que el tamaño de gotícula sea inferior a 300 nm.

d) *Comportamiento reológico y viscosidad:* se evalúa la reología y determinan los valores de viscosidad de las muestras tomadas a los distintos tiempos utilizando para ello el mismo equipo y las mismas condiciones que en estudios similares realizados en secciones anteriores. Los sistemas se consideran estables siempre que presentan valores bajos que no afectan a la integridad física de los mismos.

- Resultados y comentarios:

En las tablas 28 a 31 se resumen los resultados obtenidos en los estudios de estabilidad realizados sobre las microemulsiones múltiples de nifedipino.

Los resultados obtenidos demuestran la gran estabilidad de las formulaciones ensayadas, ya que todos los parámetros evaluados presentan valores dentro de los límites establecidos para la formulación al finalizar el estudio.

Durante los estudios de estabilidad sólo se observan anomalías leves con respecto a los valores de pH, que se producen al tercer y primer mes de estudio bajo condiciones de 30°C/60% HR y 40°C/75% HR, respectivamente.

Por lo tanto, cuanto más drásticas son las condiciones antes se observa una disminución en el pH de los sistemas dispersos estudiados. Este fenómeno puede ser debido a la liberación de una mínima cantidad de ácidos grasos libres procedente de algún fenómeno de descomposición de los componentes oleosos de la formulación, que

en ningún caso influye en la integridad física y química de las microemulsiones múltiples.

Parámetro analizado	Tiempo (meses)			
	0	1	3	6
<i>Aspecto, color y olor</i>	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
<i>Valor de pH</i>	6,84±0,04	6,95±0,09	6,89±0,07	6,67±0,11
<i>Radio hidrodinámico (nm)</i>	61,54±5,43	65,21±4,98	58,42±3,26	63,79±4,52
<i>Reología y viscosidad (D·s·cm⁻²)</i>	Newtoniano 0,757±0,045	Newtoniano 0,797±0,025	Newtoniano 0,722±0,006	Newtoniano 0,740±0,024
<i>Contenido en nifedipino (%)</i>	99,05±0,45	101,54±0,88	101,65±0,17	99,49±1,93

Tabla 28. Resultados del estudio de estabilidad de las microemulsiones múltiples (IPM/Brij®96/PG/Brij®96/PEG 400/IPM) a 4°C y 60% HR.

Parámetro analizado	Tiempo (meses)			
	0	1	3	6
<i>Aspecto, color y olor</i>	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
<i>Valor de pH</i>	6,84±0,04	6,89±0,05	6,82±0,03	6,62±0,03
<i>Radio hidrodinámico (nm)</i>	61,54±5,43	68,58±6,44	59,11±4,79	53,57±5,53
<i>Reología y viscosidad (D·s·cm⁻²)</i>	Newtoniano 0,757±0,045	Newtoniano 0,742±0,032	Newtoniano 0,702±0,022	Newtoniano 0,796±0,009
<i>Contenido en nifedipino (%)</i>	99,05±0,45	100,68±0,99	103,95±0,51	101,56±1,00

Tabla 29. Resultados del estudio de estabilidad de las microemulsiones múltiples (IPM/Brij®96/PG/Brij®96/PEG 400/IPM) a 25°C.

Parámetro analizado	Tiempo (meses)			
	0	1	3	6
Aspecto, color y olor	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Valor de pH	6,84±0,04	6,83±0,02	6,63±0,03	6,54±0,01
Radio hidrodinámico (nm)	61,54±5,43	56,95±3,31	54,19±7,24	71,47±6,88
Reología y viscosidad (D·s·cm ⁻²)	Newtoniano 0,757±0,045	Newtoniano 0,729±0,062	Newtoniano 0,699±0,005	Newtoniano 0,745±0,018
Contenido en nifedipino (%)	99,05±0,45	101,48±1,44	102,33±0,86	99,11±0,97

Tabla 30. Resultados del estudio de estabilidad de las microemulsiones múltiples (IPM/Brij®96/PG/Brij®96/PEG 400/IPM) a 30°C y 60% HR.

Parámetro analizado	Tiempo (meses)			
	0	1	3	6
Aspecto, color y olor	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Valor de pH	6,84±0,04	6,67±0,03	6,57±0,01	6,37±0,03
Radio hidrodinámico (nm)	61,54±5,43	53,72±3,49	65,58±3,62	69,44±5,79
Reología y viscosidad (D·s·cm ⁻²)	Newtoniano 0,757±0,045	Newtoniano 0,712±0,023	Newtoniano 0,698±0,008	Newtoniano 0,681±0,021
Contenido en nifedipino (%)	99,05±0,45	99,40±1,14	97,15±0,34	97,07±1,11

Tabla 31. Resultados del estudio de estabilidad de las microemulsiones múltiples (IPM/Brij®96/PG/Brij®96/PEG 400/IPM) a 40°C y 75% HR.

5.3.8.- Estabilidad de las microemulsiones múltiples de nifedipino a los ciclos de congelación y descongelación

Se trata de un estudio de estabilidad muy característico de las microemulsiones que se realiza con el fin de evaluar la integridad física y química de las microemulsiones múltiples cargadas de nifedipino constituidas por microemulsión primaria (o/a)/ Brij® 96/PEG 400/IPM en las condiciones de máximo estrés térmico.

- Método:

Para realizar el estudio se procede a someter al sistema disperso objeto de

estudio a ciclos alternos, de 24 horas, de congelación (-40°C) y descongelación (40°C) durante 7 días. Este ensayo se realiza por triplicado (n=3).

Se toman muestras inicialmente y a los 7 días sobre los que se evalúan los siguientes parámetros:

1.- Estabilidad química:

Se preparan soluciones metanólicas de las muestras tomadas a los distintos tiempos con una concentración de 10 µg/ml, que se filtran por 0,45 µm y valoran respecto a su contenido de nifedipino (n=3), por HPLC. El contenido en principio activo debe estar comprendido entre el 90-110%.

2.- Estabilidad física:

Se evalúan los cambios en el tamaño de gotícula de la fase interna, reología y viscosidad, aspecto (color, olor, transparencia e isotropía óptica) y pH de las microemulsiones múltiples de nifedipino, comparándolos con los resultados observados en las muestras estudiadas al comienzo del ensayo.

Las microemulsiones se consideran estables siempre que presentan un tamaño medio de gotículas inferior a 300 nm, comportamiento reológico newtoniano y baja viscosidad, valores de pH similares a los que presenta el sistema disperso al inicio del estudio, color amarillo y olor característico, así como un aspecto transparente y ópticamente isótropo.

- Resultados y comentarios:

Los resultados obtenidos en el estudio de estabilidad de las microemulsiones múltiples sometidas a los ciclos de congelación y descongelación aparecen reflejados en la tabla 32.

Tiempo (días)	Parámetro analizado				
	<i>Aspecto y color</i>	<i>Valor de pH</i>	<i>Reología y viscosidad (D.s. cm⁻²)</i>	<i>Contenido en nifedipino (%)</i>	<i>Radio hidrodinámico (nm)</i>
0	Cumple	6,84±0,04	Newtoniano 0,757±0,045	99,05±0,45	62,12±8,79
7	Cumple	6,77±0,03	Newtoniano 0,678±0,016	100,74±0,32	68,96±9,91

Tabla 32. Resultados del estudio de estabilidad de las microemulsiones múltiples (IPM/ Brij® 96/PG/Agua/Brij® 96/PEG 400/IPM) de nifedipino a los ciclos de congelación y descongelación.

Las microemulsiones se mantienen física y químicamente estables hasta el final del estudio. Se confirma de esta manera, la gran estabilidad tanto del principio como de la formulación en situaciones extremas de estrés térmico.

5.3.9.- Estabilidad de las microemulsiones múltiples de nifedipino en el test de centrifugación

Este estudio se evalúa la integridad física y química de las microemulsiones múltiples de nifedipino cuando se exponen a la acción de una fuerza centrífuga.

- Método:

La microemulsión múltiple cargada de nifedipino objeto de estudio se somete a centrifugación durante 20 minutos a una velocidad de 9.000 g. Este ensayo se realiza por triplicado ($n=3$). Se toman muestras al comienzo y al final del estudio sobre las que se evalúan los siguientes parámetros:

1.- Estabilidad química:

Se preparan soluciones metanólicas de las muestras tomadas a los distintos tiempos con una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$, que se filtran por 0,45 μm y valoran respecto a su contenido de nifedipino ($n=3$), por HPLC. El contenido en principio activo debe estar comprendido entre 90-110%.

2.- Estabilidad física:

Se evalúan los cambios en el tamaño de gotícula de la fase interna, reología y viscosidad, aspecto (color, olor, transparencia e isotropía óptica) y pH de las microemulsiones múltiples de nifedipino, comparándolos con los resultados observados en las muestras estudiadas al comienzo del ensayo. Las microemulsiones se consideran estables siempre que presentan tamaño medio de gotículas inferior a 300 nm, comportamiento reológico newtoniano y baja viscosidad, valores de pH similares a los que presenta el sistema disperso al inicio del estudio, color amarillo, olor característico y aspecto transparente, y ópticamente isotropo.

- Resultados y comentarios:

Los resultados obtenidos en el estudio de estabilidad de las microemulsiones múltiples sometidas al test de centrifugación aparecen reflejados en la tabla 33.

<i>Tiempo</i>	<i>Parámetro analizado</i>				
	<i>Aspecto y color</i>	<i>Valor de pH</i>	<i>Reología y viscosidad (D.s. cm^{-2})</i>	<i>Contenido en nifedipino (%)</i>	<i>Radio hidrodinámico (nm)</i>
<i>Inicio</i>	<i>Cumple</i>	6,84 \pm 0,04	Newtoniano 0,757 \pm 0,045	99,05 \pm 0,45	62,12 \pm 8,79
<i>Final</i>	<i>Cumple</i>	6,86 \pm 0,05	Newtoniano 0,718 \pm 0,022	98,85 \pm 0,22	65,38 \pm 7,93

Tabla 33. Resultados del estudio al test de centrifugación de las múltiples microemulsiones (IPM/ Brij® 96/PG/Agua/Brij® 96/PEG 400/IPM) de nifedipino.

Las muestras analizadas resultan ser física y químicamente estables al test de centrifugación, no produciéndose modificaciones significativamente importantes en los parámetros evaluados.

5.4.- Microemulsiones múltiples o/a/o constituidas por microemulsión primaria o/a, Brij® 96, propilenglicol y IPM

Otro de los intentos realizados en el desarrollo galénico de microemulsiones múltiples o/a/o con el fin de facilitar la incorporación de mayores cantidades de fase interna (microemulsión primaria o/a) y por lo tanto de principio activo es la incorporación de propilenglicol como cotensioactivo. Se selecciona el propilenglicol como componente de las microemulsiones múltiples o/a/o debido a su biocompatibilidad y su capacidad junto con el Brij® 96 para formar sistemas dispersos de fase externa oleosa.

5.4.1.- Componentes de las microemulsiones múltiples o/a/o

A – Microemulsión primaria o/a IPM/ Brij® 96/propilenglicol/agua:

Constituye la fase interna de las microemulsiones múltiples o/a/o, constituida por 15% de IPM, 30% de Brij® 96/propilenglicol (2:1; p/p) y 55% de agua. Su desarrollo galénico y caracterización se describen en el apartado 5.1.7.

B- Fase Oleosa:

Constituye la fase externa de nuestros sistemas dispersos, se selecciona el miristato de isopropilo (IPM), descrito de detalladamente en el apartado 5.1.1.

C - Tensioactivo:

Como tensioactivo se selecciona el Brij® 96 por su capacidad de originar una gran área de formación de microemulsiones (apartado 5.1.4.2). Se describe ampliamente en el apartado 5.1.4.1.

D – Cotensioactivo:

El cotensioactivo empleado para favorecer la formación de los sistemas dispersos y la incorporación de nifedipino es el propilenglicol (PG). Este cotensioactivo se describe ampliamente en el apartado 5.1.7.1.

5.4.2.- Diseño de microemulsiones múltiples o/a/o

Para determinar la composición de las microemulsiones, se construyen los diagramas de fases pseudo-ternarios con los componentes de la formulación y se delimita el área correspondiente a estos sistemas dispersos.

- Método:

Para la construcción de los diagramas de fases se sigue un método que consta de dos etapas (Ferreira y cols., 1994a). En la primera etapa se desarrolla la microemulsión primaria o/a (apartado 5.1.7.) y en la segunda etapa se valora volumétricamente a 25°C la microemulsión primaria o/a IPM/Brij® 96/PEG 400/agua (15/30/55; p/p/p) con una mezcla constituida por IPM, Brij® 96 y propilenglicol, encontrándose estos dos últimos en proporciones definidas dentro del intervalo comprendido entre 1:1 y 4:1 (p/p). En el vértice superior del sistema del triángulo se sitúan el tensioactivo y el cotensioactivo indicándose entre paréntesis la proporción de ambos correspondiente a cada diagrama de fases. Aquellos sistemas que presentan transparencia e isotropía óptica, al observar su comportamiento mediante la luz polarizada a través de prismas de Nicols, se consideran como microemulsiones, pudiéndose delimitar las regiones de los distintos diagramas correspondientes a las áreas de formación de dichos.

Se realizan los siguientes ensayos de tipo cualitativo para determinar el signo de la microemulsión múltiple, al igual que se hizo en el apartado 5.2.2.:

- 1) ensayo de dilución
- 2) ensayo de solubilidad de un colorante de carácter lipófilo (Sudán III) en la fase continua.

- Resultados y comentarios:

Los diagramas de fases pseudo-ternarios y las áreas de formación de las microemulsiones múltiples (microemulsión primaria (o/a)/ Brij® 96/propilenglicol/IPM) aparecen representados en las figuras 78 a 81.

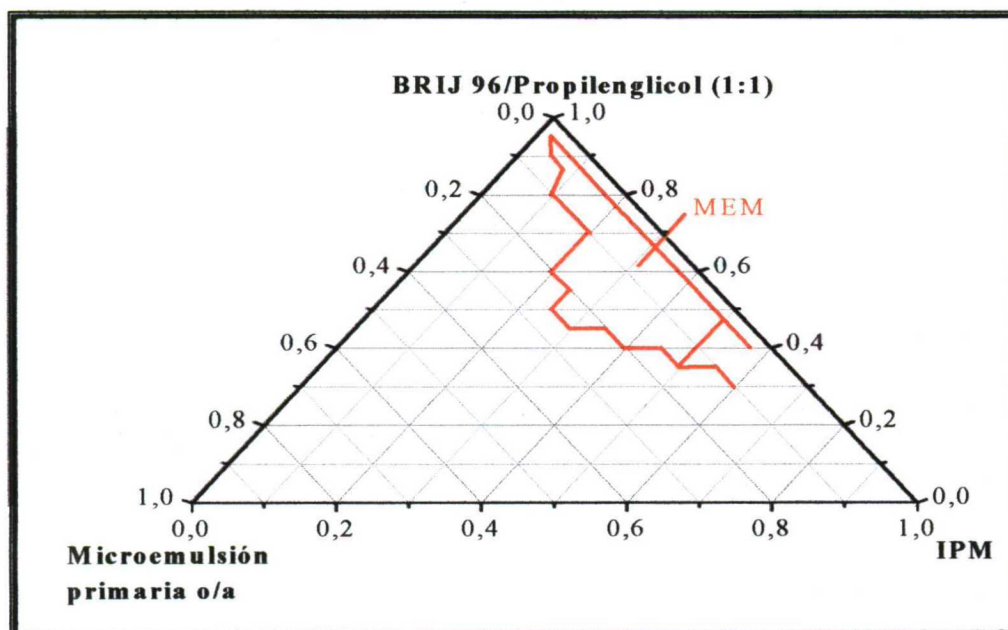


Figura 78. Diagrama de fases pseudo-ternario y área de formación de microemulsiones múltiples para sistemas constituidos por microemulsión primaria (o/a)/ Brij® 96/PG/IPM con una proporción Brij® 96/PG de 1:1 (p/p).

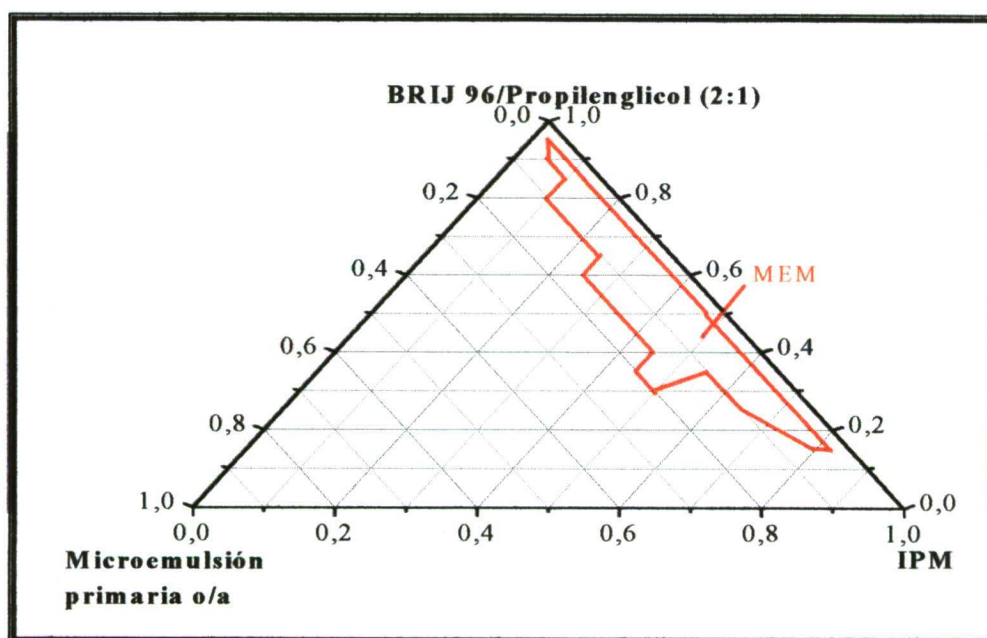


Figura 79. Diagrama de fases pseudo-ternario y área de formación de microemulsiones múltiples para sistemas constituidas por microemulsión primaria (o/a)/ Brij® 96/PG/IPM con una proporción Brij® 96/PG de 2:1 (p/p).

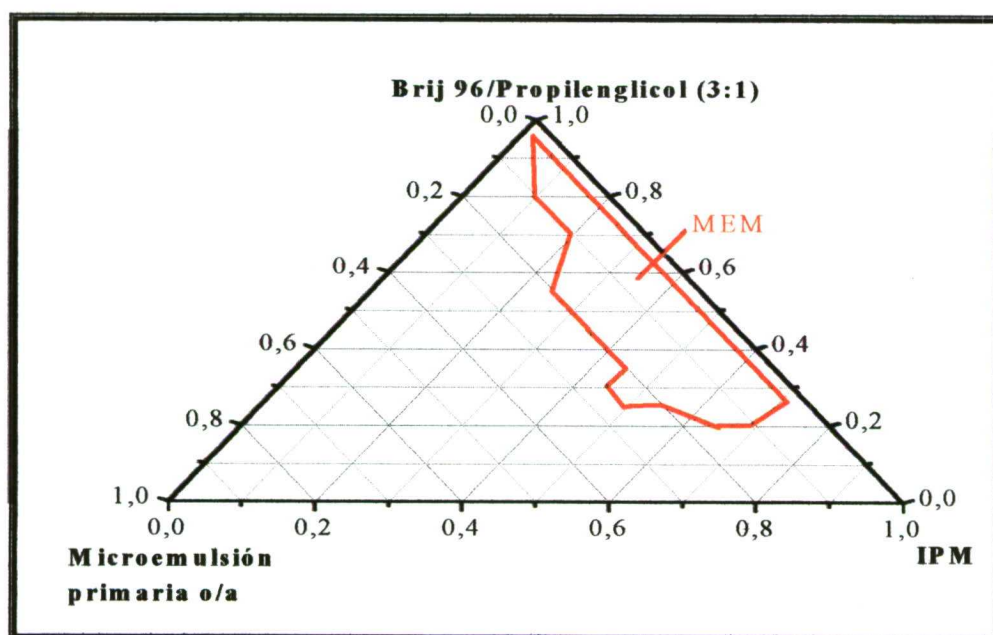


Figura 80. Diagrama de fases pseudo-ternario y área de formación de microemulsiones múltiples para sistemas constituidos por microemulsión primaria (o/a)/ Brij® 96/PG/IPM con una proporción Brij® 96/PG de 3:1 (p/p).

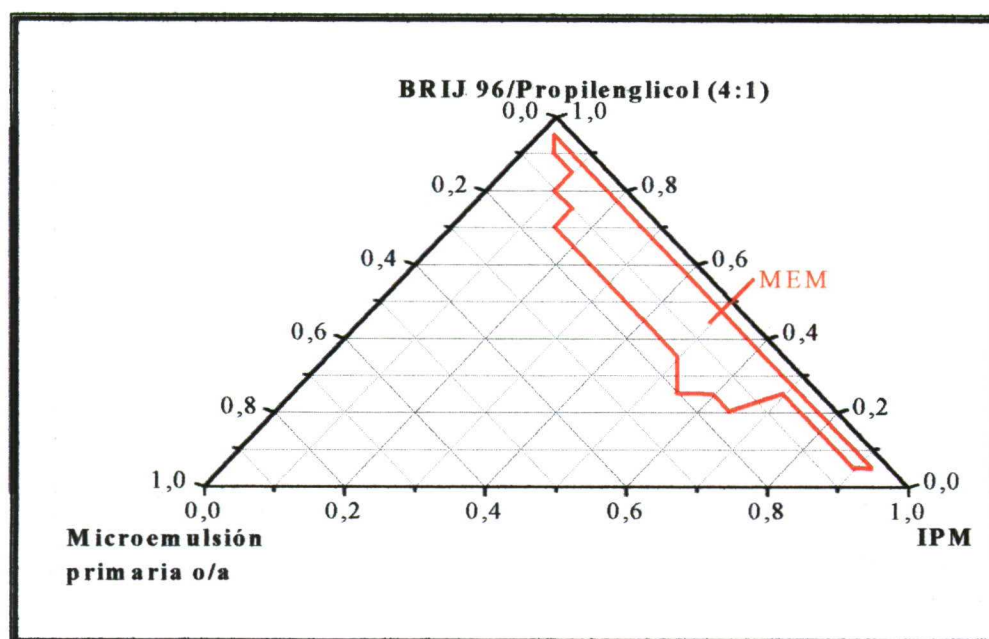


Figura 81. Diagrama de fases pseudo-ternario y área de formación de microemulsiones múltiples para sistemas constituidos por microemulsión primaria (o/a)/ Brij® 96/PG/IPM con una proporción Brij® 96/PG de 4:1 (p/p).

La máxima cantidad de fase interna (microemulsión primaria o/a) que se puede incorporar en los sistemas dispersos (25%), así como el mayor área de formación de microemulsiones, con un requerimiento tensioactivo/cotensioactivo adecuado para la administración transdérmica (25-30%), se obtienen con una relación Brij® 96/propilenglicol de 3:1. Este hecho es de gran importancia a la hora de incorporar el principio activo a las microemulsiones múltiples, ya que se deben seleccionar aquellos sistemas dispersos localizados en el interior, no en los límites, del área de formación de los mismos con el fin de evitar problemas de estabilidad. Por lo tanto, se selecciona la proporción tensioactivo/cotensioactivo 3:1 ya que permite incorporar la mayor cantidad de fase interna y por lo tanto de principio activo a las microemulsiones múltiples o/a/o.

Por último, debemos destacar que la utilización de propilenglicol como cotensioactivo permite incorporar a las microemulsiones múltiples constituidas por microemulsión primaria (o/a)/ Brij® 96propilenglicol/IPM un 10% más de fase interna que aquellas microemulsiones múltiples formuladas sin cotensioactivo (apartado 5.2.2.). Los ensayos de dilución y solubilización realizados sobre las microemulsiones múltiples confirman que dichos sistemas son de fase externa oleosa.

5.4.3.- Reología de las microemulsiones múltiples o/a/o

5.4.3.1- Influencia de la relación Brij® 96/PG sobre el comportamiento reológico de las microemulsiones múltiples o/a/o

En esta sección se evalúa el efecto producido por la variación de la relación Brij® 96/PG sobre la reología y la viscosidad de los sistemas dispersos objeto de estudio.

- Método:

Los ensayos se realizan sobre microemulsiones múltiples o/a/o con el mismo contenido en fase interna (microemulsión primaria o/a) (15% en peso), fase externa (30% en peso) y tensioactivos totales (55% en peso), variándose únicamente la relación Brij®/PG comprendido entre 2:1 a 4:1.

Las medidas se realizan con el mismo equipo y condiciones que se han utilizado en los apartados anteriores para este tipo de estudios. Se realizan 3 determinaciones por muestra para un total de 3 muestras (n=9).

- Resultados y comentarios:

La figura 82 muestra el comportamiento reológico de las microemulsiones estudiadas a partir de la representación gráfica de la fuerza de cizalla realizada sobre el sistema, en función del intervalo de cizalla sobre el que se ejerce.

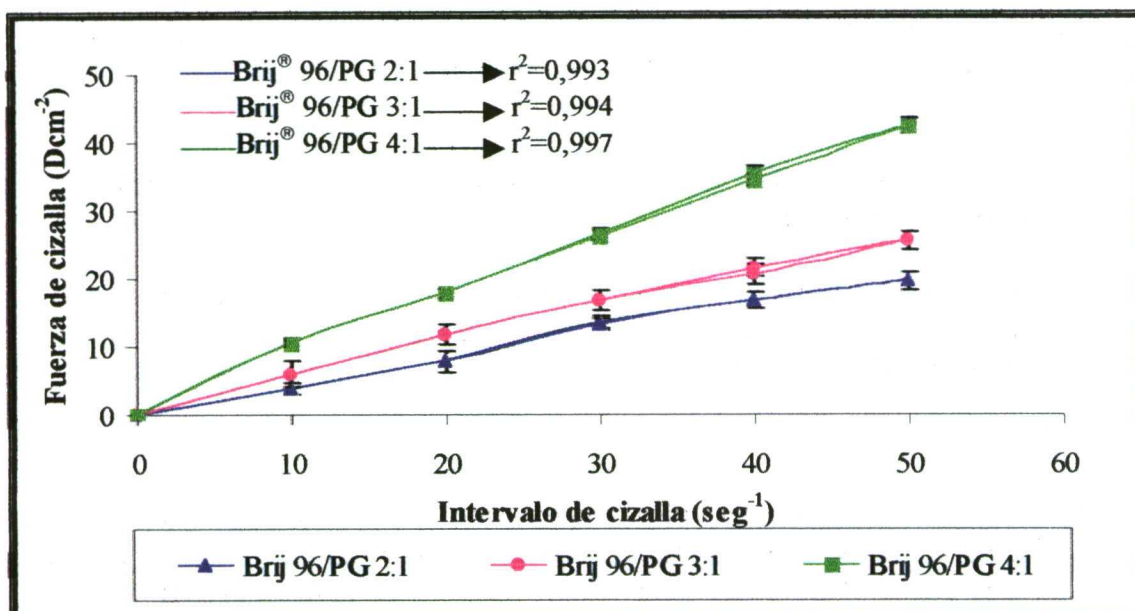


Figura 82. Comportamiento reológico de las microemulsiones múltiples en función de la proporción Brij® 96/PG.

Las microemulsiones múltiples estudiadas con distintas proporciones Brij® 96/propilenglicol demuestran tener un comportamiento newtoniano, con valores de coeficiente de determinación próximos a la unidad ($> 0,99$). Este comportamiento está más definido a medida que aumenta la relación tensioactivo/cotensioactivo. Debido a este tipo de comportamiento reológico, los valores de viscosidad se obtienen a partir de las pendientes de las rectas intervalo de cizalla/fuerza de cizalla para todos los sistemas dispersos estudiados.

La figura 83 muestra las variaciones en la viscosidad de los sistemas estudiados originadas por las distintas proporciones Brij® 96/propilenglicol que los constituyen.

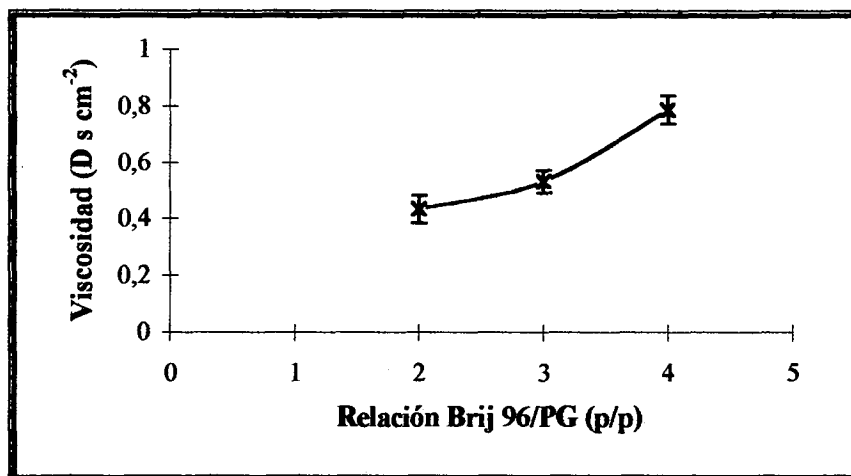


Figura 83. Influencia de la proporción Brij[®] 96/PG sobre la viscosidad de las microemulsiones múltiples.

La viscosidad de los sistemas estudiados se incrementa considerablemente a medida que aumenta la proporción tensioactivo/cotensioactivo, siendo este incremento más apreciable al pasar de la proporción Brij[®] 96/PG 3:1 a la 4:1.

5.4.3.2.-Influencia del contenido total Brij[®] 96/propilenglicol sobre el comportamiento reológico de las microemulsiones múltiples o/a/o

En este apartado se evalúa el efecto producido por la variación del contenido total tensioactivo/cotensioactivo (Brij[®] 96/PG) sobre la reología y la viscosidad de los sistemas dispersos objeto de estudio.

- Método:

Los ensayos se realizan sobre microemulsiones con el mismo contenido en fase interna (10% en peso) y una proporción variable de tensioactivo/cotensioactivo, por lo tanto de fase oleosa (IPM), dentro del intervalo comprendido entre el 30 y el 45% en peso, con una relación Brij[®] 96/PG fija de 3:1 (p/p). Las medidas se efectúan con el mismo equipo y las mismas condiciones que las empleadas en los apartados anteriores. Se realizan 3 determinaciones por muestra para un total de 3 muestras (n=9).

- Resultados y comentarios:

La figura 84 muestra el comportamiento reológico de las microemulsiones múltiples estudiadas a partir de la representación gráfica de la fuerza de cizalla, realizada sobre el sistema, en función del intervalo de cizalla sobre el que se ejerce.

Las microemulsiones estudiadas presentan coeficientes de determinación muy parecidos entre sí y próximos a la unidad (>0,99). Por este motivo, todos los sistemas dispersos se consideran newtonianos y los valores de viscosidad se obtienen a partir de las pendientes de las rectas intervalo de cizalla/fuerza de cizalla de cada una de las microemulsiones múltiples estudiadas.

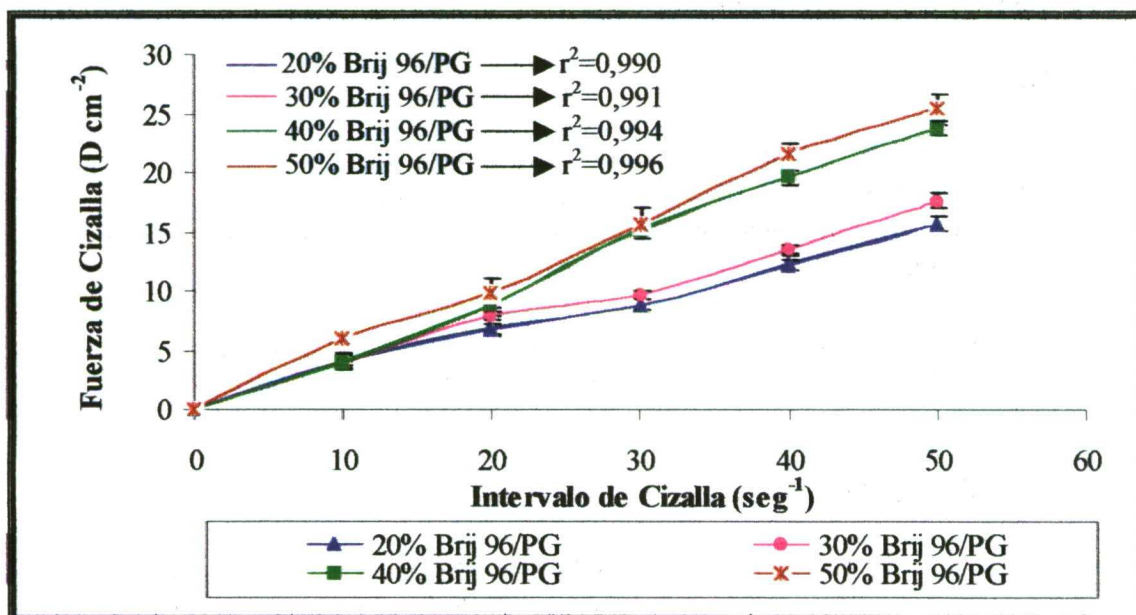


Figura 84. Comportamiento reológico de las microemulsiones múltiples en función del contenido total Brij® 96/PG.

La figura 85 representa las variaciones en la viscosidad de los sistemas en función del contenido tensioactivo/cotensioactivo.

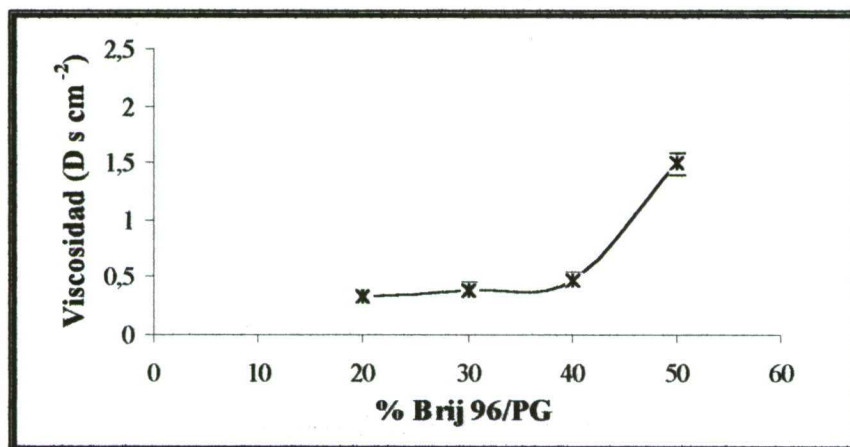


Figura 85. Influencia de la proporción Brij® 96/PG sobre la viscosidad de las microemulsiones múltiples.

Los resultados obtenidos permiten afirmar que la viscosidad de las microemulsiones estudiadas aumenta, aunque de manera moderada, a medida que lo hace la concentración tensioactivo/cotensioactivo del 20 al 30%, siendo este incremento más significativo al pasar del 30 al 40% de Brij® 96/PG.

5.4.3.3.- Influencia del contenido en fase interna sobre el comportamiento reológico de las microemulsiones múltiples o/a/o

En esta sección se evalúa el efecto producido por la variación del contenido en fase interna (microemulsión primaria o/a) sobre la reología y la viscosidad de los

sistemas dispersos objeto de estudio.

- Método:

Los ensayos se realizan sobre microemulsiones que presentan el mismo contenido en Brij® 96/PG (30%) con una relación fija (3:1, p/p) y una proporción variable de fase interna (microemulsión primaria o/a) dentro del intervalo comprendido entre el 5 y el 20% en peso.

Las medidas se efectúan con el mismo equipo y las mismas condiciones empleadas en los aparatos anteriores. Se realizan 3 determinaciones por muestra para un total de 3 muestras (n=9).

- Resultados y comentarios:

La figura 86 muestra el comportamiento reológico de las microemulsiones múltiples estudiadas a partir de la representación gráfica fuerza de cizalla/intervalo de cizalla.

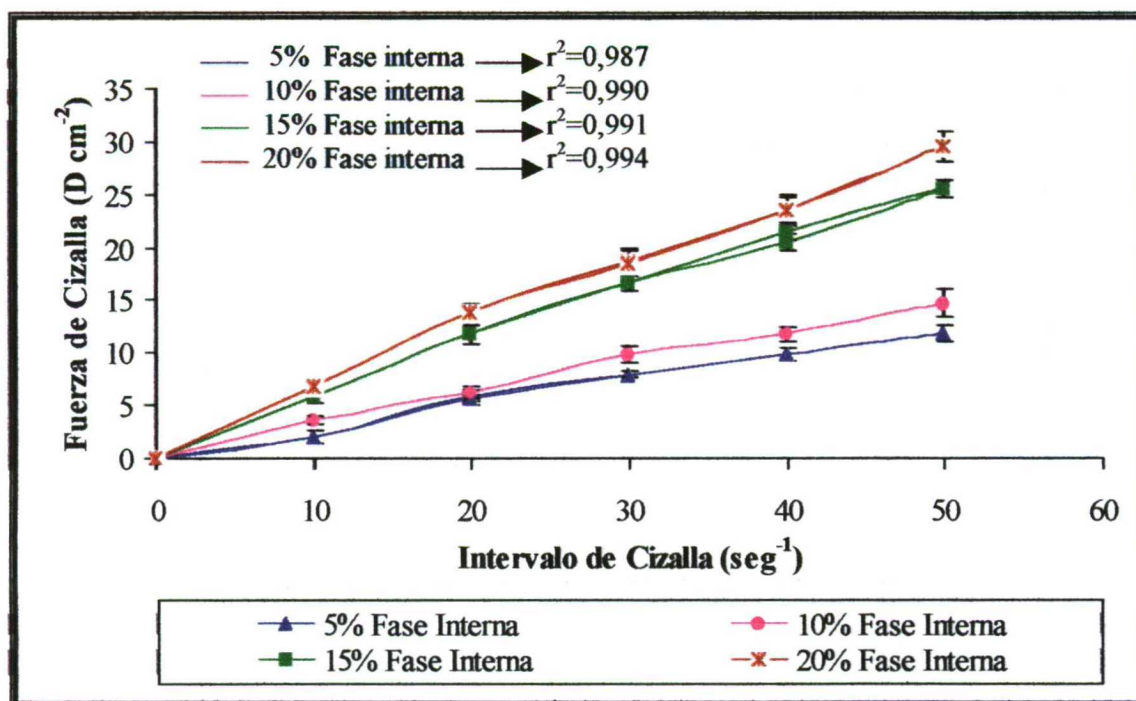


Figura 86. Comportamiento reológico de las microemulsiones múltiples en función de su contenido en fase interna (microemulsión primaria o/a).

A medida que aumenta el contenido en fase interna de las microemulsiones múltiples, los sistemas dispersos muestran un comportamiento newtoniano más definido. La viscosidad se determina a partir del valor de la pendiente de la recta intervalo de cizalla/fuerza de cizalla para las microemulsiones múltiples estudiadas. Para el sistema constituido por un 5% de fase interna se toma como valor de viscosidad el medido por el viscosímetro a la mayor velocidad de giro del disco (25 r.p.m.).

La figura 87 representa las variaciones en la viscosidad de las microemulsiones múltiples en función de su contenido en fase interna.

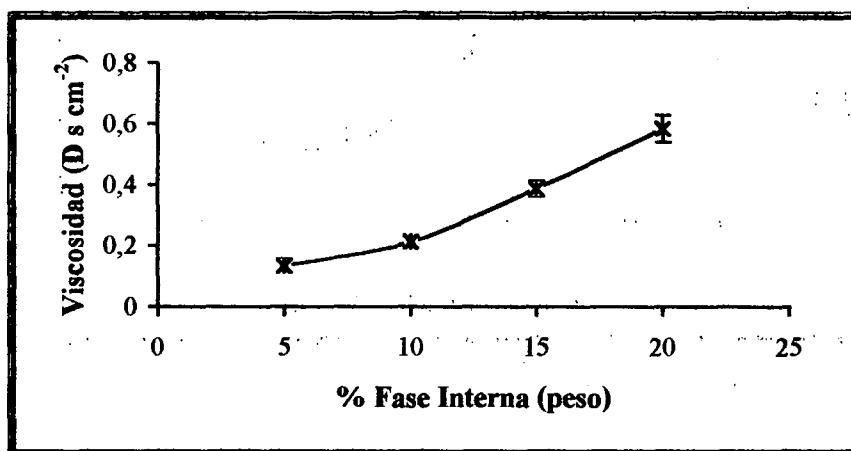


Figura 87. Influencia del contenido en fase interna (microemulsión primaria o/a) sobre la viscosidad de las microemulsiones múltiples.

5.4.4.- Estudio del tamaño de gotícula de la fase interna de las microemulsiones múltiples o/a/o

5.4.4.1.- Influencia de la relación Brij®96/Propilenglicol sobre el tamaño de gotícula de las microemulsiones múltiples o/a/o

Este estudio se realiza con el fin de evaluar las variaciones en los radios hidrodinámicos (R_h) de las gotículas constituyentes de la fase interna de las microemulsiones múltiples, en función de la relación en peso del tensioactivo/cotensioactivo presente en las mismas.

- Método:

Los ensayos se realizan sobre microemulsiones múltiples o/a/o con el mismo contenido en fase interna (15% en peso de microemulsión primaria o/a), tensioactivo/cotensioactivo (30% en peso) y fase externa (55% en peso), variándose únicamente la relación Brij®96/PG dentro del intervalo comprendido entre 2:1 y 4:1.

La determinación de los radios hidrodinámicos de las gotículas de la fase interna que constituyen de las microemulsiones múltiples se realiza por PCS. El equipo y las condiciones empleadas durante la medida de las muestras, así como el tratamiento de los datos obtenidos se han explicado detalladamente en el apartado 5.1.9.1. Se preparan las muestras por duplicado y se realizan 3 determinaciones por muestra.

- Resultados y comentarios:

La figura 88 representa las variaciones en el radio hidrodinámico (R_h) de las gotículas de fase interna de las microemulsiones múltiples en función de la relación tensioactivo/cotensioactivo presente en las mismas.

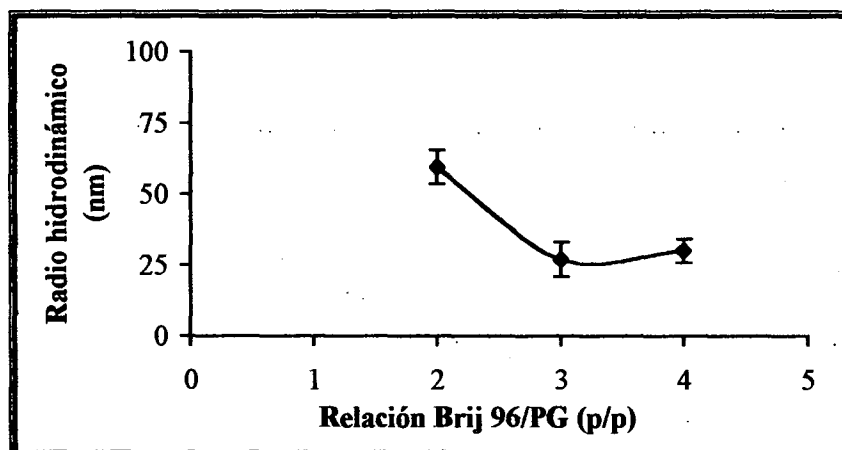


Figura 88. Influencia de la relación Brij[®]96/PG sobre el tamaño de gotícula de las microemulsiones múltiples o/a/o.

La relación Brij[®]96/PG ejerce cierta influencia en el tamaño de gotícula de fase interna de las microemulsiones múltiples, observándose una reducción considerable en el radio hidrodinámico de las gotículas al pasar de la relación tensioactivo/cotensioactivo 2:1 a 3:1. Sin embargo, con la relación Brij[®]96/PG 4:1 se produce un aumento del radio hidrodinámico. Por lo tanto, a la vista de los resultados obtenidos se puede concluir que el propilenglicol, en la proporción tensioactivo/cotensioactivo 3:1, contribuye de manera eficaz en la reducción del tamaño de gota. Este hecho podría explicar que con esta proporción se obtenga la mayor área de formación de microemulsiones.

5.4.4.2.- Influencia del contenido total en Brij[®] 96/Propilenglicol sobre el tamaño de gotícula de las microemulsiones múltiples o/a/o

En esta sección se evalúa el efecto producido por la variación del contenido total tensioactivo/cotensioactivo sobre el radio hidrodinámico de las gotículas constituyentes de la fase dispersa de las microemulsiones múltiples estudiadas.

- Método:

Los ensayos se realizan sobre microemulsiones múltiples con el mismo contenido de fase interna (10% en peso), y una proporción variable tensioactivo/cotensioactivo dentro del intervalo comprendido entre 30 y el 45% en peso con una relación fija Brij[®]96/PG correspondiente a 3:1 (p/p).

El equipo y las condiciones empleadas en este ensayo, así como el tratamiento de los datos obtenidos se han explicado detalladamente en el apartado 5.1.9.1. Se preparan las muestras por duplicado y se realizan 3 determinaciones por muestra.

- Resultados y comentarios:

La figura 89 representa las variaciones en el radio hidrodinámico de las gotículas de la fase interna de las microemulsiones múltiples, en función del contenido total tensioactivo/cotensioactivo.

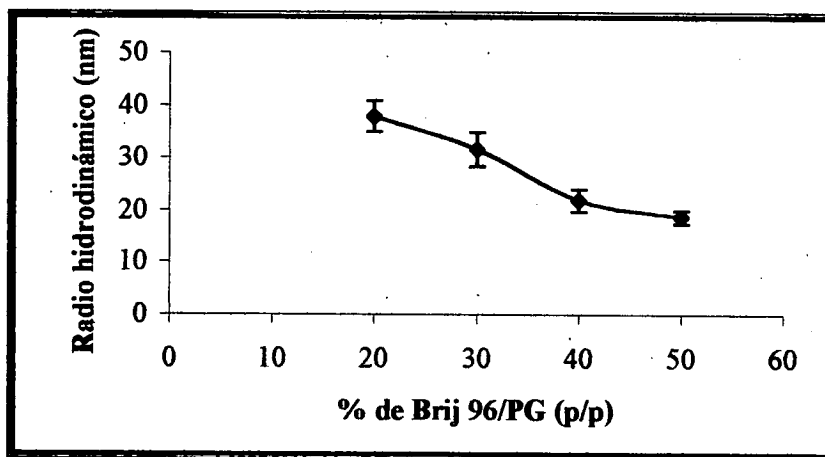


Figura 89. Influencia del contenido total Brij®96/PG sobre el tamaño de gotícula de las microemulsiones múltiples o/a/o.

El radio hidrodinámico de las microemulsiones múltiples se encuentra influenciado por el contenido total tensioactivo/cotensioactivo, produciéndose una disminución de este parámetro a medida que aumenta el contenido Brij®96/PG. Este efecto se produce de manera más significativa al pasar del 30 al 40% en contenido total tensioactivo/cotensioactivo.

5.4.4.3.- Influencia del contenido en fase interna sobre el tamaño de gotícula de las microemulsiones múltiples o/a/o

En esta sección se evalúa el efecto producido por la variación del contenido en fase interna (microemulsión primaria) sobre el radio hidrodinámico de las gotículas que constituyen de la fase dispersa de las microemulsiones múltiples estudiadas.

- Método:

Los ensayos se realizan sobre microemulsiones múltiples que presentan el mismo contenido tensioactivo/cotensioactivo (30% en peso) con una relación fija (3:1, p/p) y una proporción variable de fase interna (microemulsión primaria o/a) dentro del intervalo comprendido entre el 5 y el 20% en peso.

Las medidas se efectúan con el mismo equipo y las mismas condiciones empleadas en los apartados anteriores. Se preparan las muestras por duplicado y se realizan 3 determinaciones por muestra.

- Resultados y comentarios:

La figura 90 representa las variaciones en el radio hidrodinámico de las gotículas de las microemulsiones, en función de su contenido en fase interna (microemulsión primaria o/a). Como se puede observar, el tamaño de gotícula de las microemulsiones múltiples estudiadas está claramente influenciado por el contenido en fase interna (microemulsión primaria) presente en las mismas. Así, el radio hidrodinámico de las gotículas de la fase dispersa incrementa a mediada que lo hace el

contenido en fase interna. Este efecto se aprecia con más claridad al pasar del 5 al 10% y del 15 al 20% de fase interna (microemulsión primaria o/a).

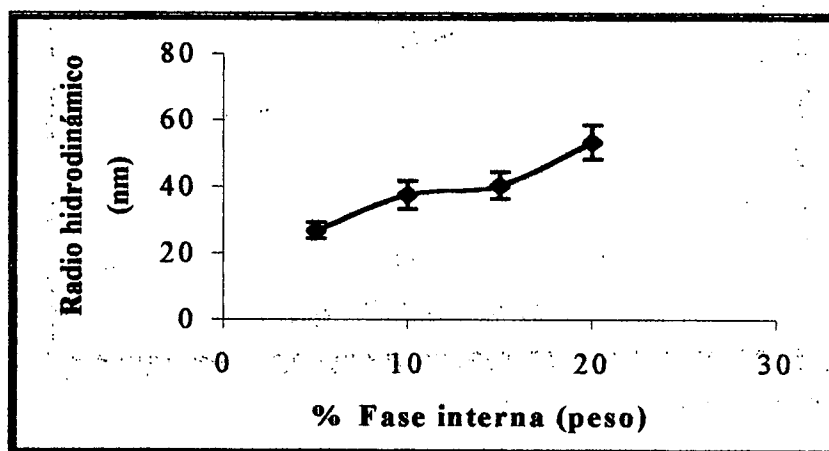


Figura 90. Influencia del contenido en fase interna sobre el tamaño de gotícula de las microemulsiones múltiples.

5.4.5.- Incorporación de nifedipino en la microemulsión múltiple o/a/o

Para la incorporación del principio activo se selecciona la microemulsión múltiple con el mayor contenido de fase interna (20% de microemulsión primaria (o/a) Brij®96/PG, 2:1 p/p) y menor proporción de tensioactivo/cotensioactivo necesaria para su formación (30%), con una relación Brij®96/PG correspondientes a 3:1. La incorporación del principio activo se realiza tanto en la fase interna (microemulsión primaria o/a), así como en la fase externa (IPM) con el fin de producir una dosis de ataque que permita disminución del tiempo de latencia. Este parámetro constituye el principal factor limitante durante la absorción de fármacos cuando se administra por vía transdérmica.

La cantidad de nifedipino incorporada a 10 ml de múltiple microemulsión o/a/o es de 1,12 mg/ml, teniendo en cuenta que la máxima cantidad de nifedipino incorporada en la microemulsión primaria o/a es de $5,61 \pm 0,19 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ (apartado 5.1.7.5.). Sin embargo, esta cantidad es insuficiente para la desarrollo de un sistema de liberación controlada que permita su aplicación en un área razonable ($10\text{-}30 \text{ cm}^2$) con el fin de alcanzar niveles terapéuticos eficaces (Diez y cols. 1991 y Ruan y cols. 1992). Según los estudios realizados por estos autores con el nifedipino y el nitrendipino, la dosis adecuada para la administración transdérmica de estos principios activos durante un periodo de 48 horas es de 40 mg aproximadamente.

5.4.5.1.- Incremento de la cantidad incorporada de nifedipino en la fase interna de la microemulsión múltiple o/a/o

El procedimiento empleado es el mismo que el desarrollado para las microemulsiones múltiples constituidas por microemulsión primaria o/a/ Brij®96/PEG 400/IPM en el apartado 5.3.5.1 ya que ambos sistemas dispersos presentan la misma

composición y porcentaje de fase interna (microemulsión primaria o/a) a la que se le incorpora la misma cantidad de principio activo (36 mg).

5.4.5.2.- Caracterización de la microemulsión primaria o/a constituida por IPM/DMA (4:1), Brij® 96, propilenglicol y agua

Como se ha comentado anteriormente la fase interna de la microemulsión múltiple descrita en este apartado es la misma que para el sistema disperso constituido por microemulsión primaria o/a/ Brij®96/PEG 400/IPM por lo que la caracterización de la microemulsión primaria o/a se encuentra ampliamente descrita en el apartado 5.3.5.3.

5.4.5.3.- Incorporación de nifedipino en la fase externa (IPM) de la microemulsión múltiple

Este procedimiento se encuentra ampliamente descrito en el apartado 5.3.5.2 para las microemulsión múltiple constituidas por microemulsión primaria (o/a)/ Brij®96/PEG 400/IPM, ya que los sistemas dispersos objeto de estudio en este apartado presentan la misma porcentaje de fase externa (50%), a la que se le incorpora la misma concentración de principio activo ($0,8 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). La cantidad total incorporada a la microemulsión múltiple es de 40 mg/10 ml de microemulsión múltiple.

Una vez incorporada el principio activo en la fase interna y externa, el desarrollo de la microemulsión múltiple se realiza conforme a lo descrito en el apartado 5.4.2.

5.4.6.-Caracterización de las microemulsiones múltiples constituidas por microemulsión primaria (o/a)/Brij®96/PG/IPM (20/30/50; p/p/p)con nifedipino incorporado en fase interna y externa

5.4.6.1.-Aspecto y color

- Método:

La caracterización de las propiedades organolépticas se lleva a cabo por la observación directa de la microemulsión múltiple o/a/o recién preparada.

- Resultados y comentarios:

Las microemulsiones obtenidas presentan un aspecto homogéneo transparente, sin partículas en suspensión o precipitadas, resultando ser isótropas ópticamente al evaluar su comportamiento frente a la luz polarizada mediante prismas de Nicols. Además, se observa una coloración amarillenta cuando el nifedipino se incorpora a la microemulsión siendo transparente e incolora en su ausencia.

Se confirma, mediante el ensayo de dilución con IPM y de solubilización con un colorante liposoluble (Sudán III), que la incorporación de nifedipino no modifica el

signo de la microemulsión.

5.4.6.2.- Reología y viscosidad de las microemulsiones múltiples o/a/o

A continuación se describen los estudios realizados sobre el comportamiento reológico y viscosidad de la microemulsión múltiple (microemulsión primaria (o/a)/Brij®96/PG /IPM) cargadas con principio activo en fase externa e interna. Los resultados obtenidos se comparan con los observados al determinar dichas propiedades en el mismo sistema disperso sin nifedipino.

- Método:

La viscosidad de los distintos sistemas se determina a 25°C con el mismo equipo y las mismas condiciones empleadas en este tipo de estudios, realizados en apartados anteriores.

-Resultados y comentarios:

La figura 91 representa las gráficas fuerza/intervalo de cizalla de las microemulsiones múltiples o/a/o constituidas por microemulsión primaria (o/a)/Brij®96/PG/IPM con y sin nifedipino.

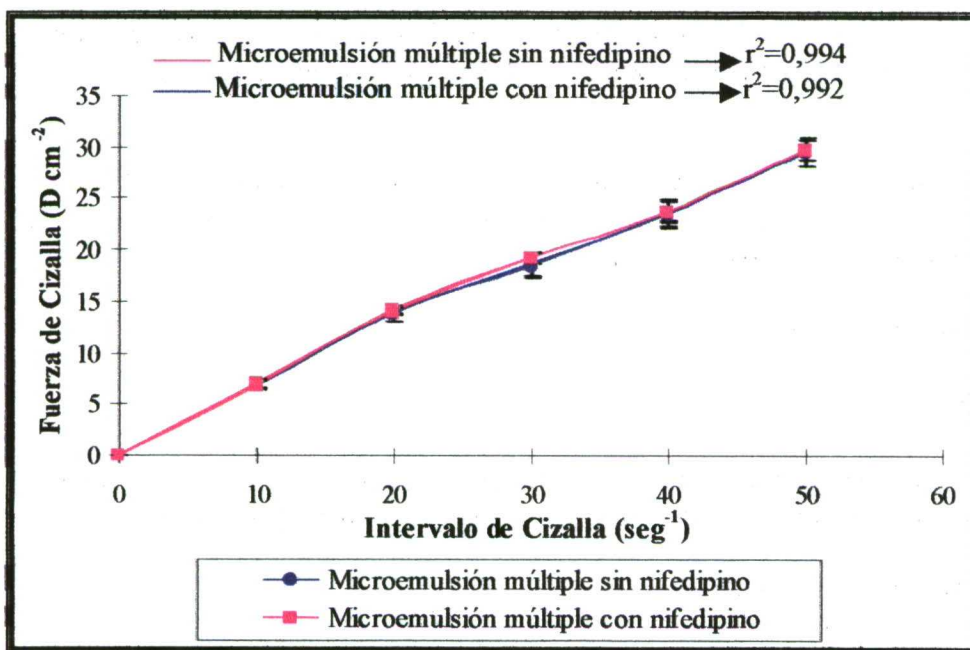


Figura 91. Comportamiento reológico de las microemulsiones múltiples con y sin nifedipino

Como se puede observar, las microemulsiones múltiples o/a/o con y sin nifedipino presentan perfiles prácticamente solapables. Los coeficientes de determinación para ambas microemulsiones son muy parecidos y próximos a la unidad ($>0,99$), indicando el comportamiento claramente newtoniano de las mismas.

Por lo tanto, la viscosidad de ambos sistemas dispersos se determina mediante el valor de la pendiente de la recta fuerza de cizalla/intervalo de cizalla. Los valores de viscosidad obtenidos son de $0,589 \pm 0,047$ y $0,582 \pm 0,044$ D·s·cm⁻² para las microemulsiones múltiples con y sin principio activo, respectivamente. A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que la incorporación de nifedipino en la fase interna (microemulsión primaria) y externa (IPM) no modifica el comportamiento reológico ni la viscosidad del sistema disperso.

5.4.6.3.- Tamaño de gotícula de las microemulsiones múltiples o/a/o

- Método:

La determinación de los radios hidrodinámicos de las gotículas constituyentes de la fase dispersa de las microemulsiones múltiples con nifedipino se realiza por PCS, utilizándose para ello el mismo equipo y las mismas condiciones empleadas para los estudios de este tipo realizados en apartados anteriores de este capítulo.

- Resultados y comentarios:

En la figura 92 se observa la distribución de las velocidades de decaimiento o inversos del tiempo de relajación (Γ en μs^{-1}) obtenidos para un ángulo de 90° y una probabilidad de rechazo de 0,5 de las microemulsiones múltiples o/a/o constituidas por microemulsión primaria (o/a)/Brij® 96PG/IPM cargadas con y sin nifedipino.

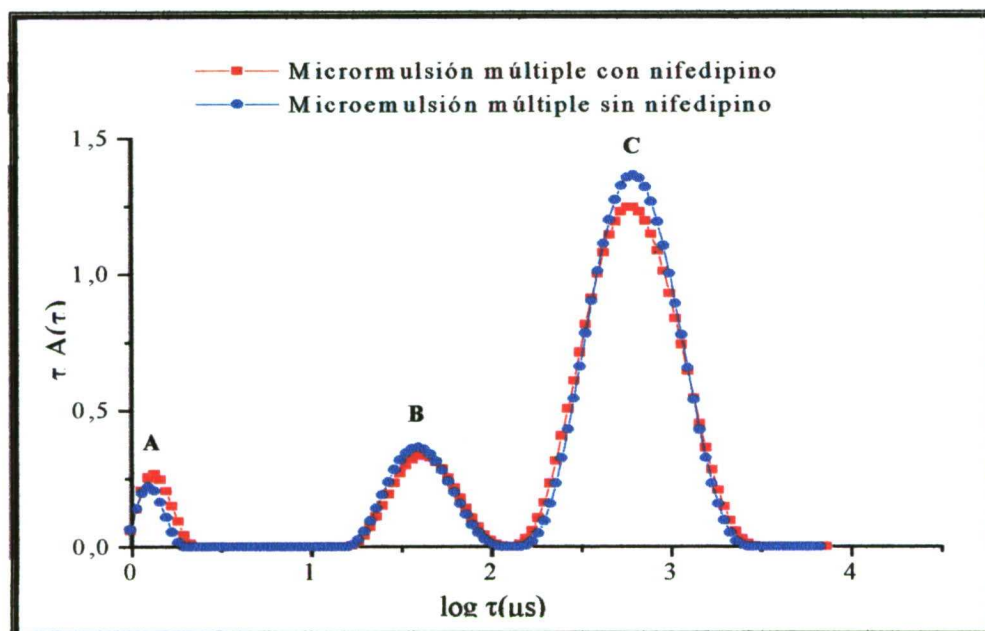


Figura 92. Funciones de distribución de los tiempos de relajación para las microemulsiones múltiples o/a/o constituidas por microemulsión primaria (o/a)/Brij® 96PG /IPM en presencia y ausencia de nifedipino.

Las funciones de distribución de los tiempos de relajación para las microemulsiones múltiples cargadas con nifedipino y sin nifedipino se caracterizan por tener tres máximos (A, B y C). En cada función de distribución cada máximo indica la

existencia una población con radios hidrodinámicos muy diferenciados al presentar distintos inversos del tiempo de relajación.

Las funciones de distribución de los tiempos de relajación para los sistemas dispersos cargados con y sin nifedipino son muy similares. Los máximos A y B en ambas funciones de distribución para las microemulsiones múltiples con y sin nifedipino se superponen completamente, presentando valores de los inversos del tiempo de relajación muy similares entre sí. Mientras que, el máximo C de la función de distribución correspondiente a la múltiple microemulsión cargada con nifedipino es ligeramente inferior a la de la múltiple microemulsión sin nifedipino, presentando pequeñas diferencias en los valores de los inversos de los tiempos de relajación que se traducen en pequeñas diferencias en los radios hidrodinámicos medios obtenidos para ambos sistemas dispersos.

Para la microemulsión múltiple sin nifedipino los radios hidrodinámicos obtenidos a partir de los inversos del tiempo de relajación para los máximos A, B y C son de $1,6 \pm 0,4$, $14,2 \pm 4,6$ y $135,9 \pm 12,5$ nm y la contribución de cada máximo al total es de 4,3, 11,5 y 84,2% respectivamente. El radio hidrodinámico medio de gotícula presenta un valor de $50,6 \pm 7,8$ nm.

Para la microemulsión múltiple cargada con nifedipino los radios hidrodinámicos obtenidos a partir del tiempo de relajación para los máximos A, B y C son de $1,3 \pm 0,8$, $13,9 \pm 6,4$ y $145,7 \pm 15,3$ nm y la contribución de cada máximo al total es de 4,8, 9,2 y 85,9% respectivamente. El radio hidrodinámico medio de gotícula determinado para este tipo de sistemas dispersos es de $53,6 \pm 6,8$ nm.

Por lo tanto, a la vista de los datos obtenidos y después de realizar un análisis estadístico multifactorial (ANOVA) para una $P < 0,05$ y un intervalo de confianza del 95%, se puede concluir que, al incorporar nifedipino en la fase interna (microemulsión primaria) y externa (IPM) no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los radios hidrodinámicos de las poblaciones, correspondientes a los máximos A, B y C de las funciones de distribución, de ambos sistemas dispersos. Tampoco, se observan diferencias significativas, al realizar el mismo análisis estadístico, en el radio hidrodinámico medio de las microemulsiones múltiples o/a/o con y sin nifedipino.

5.4.6.4.-Determinación del pH en las microemulsiones múltiples o/a/o

- Método:

La determinación del pH de este sistema disperso se lleva a cabo con un pHmetro Crison micropH 2002. El número de determinaciones por muestra es de 4 ($n=4$).

- Resultados y comentarios:

El valor medio de pH obtenido en las determinaciones realizadas es de $5,49 \pm 0,07$, siendo muy similar este valor al obtenido para la microemulsión múltiple sin

nifedipino ($5,41 \pm 0,05$).

5.4.7.- Estabilidad de las microemulsiones múltiples o/a/o frente a la temperatura y la humedad

Estos estudios de estabilidad tienen como finalidad la determinación de las condiciones óptimas de conservación de estas microemulsiones múltiples de nifedipino.

- Método:

Se disponen muestras de las microemulsiones múltiples cargadas con nifedipino en viales cerrados de vidrio protegidos de la luz. Las muestras se someten durante 6 meses a las siguientes condiciones:

- Temperatura 4°C y humedad relativa (HR) del 60%.
- Temperatura 25°C.
- Temperatura 30°C y humedad relativa (HR) del 60%.
- Temperatura 40°C y humedad relativa (HR) del 75%.

Se toman muestras a tiempo 0 y a los 1, 3 y 6 meses, sobre las que se evalúan los siguientes parámetros.

1.- Estabilidad química:

Se preparan soluciones metanólicas, con una concentración de 10 µg/ml, de las muestras tomadas a los distintos tiempos, se filtran por 0,45 µm y se valoran respecto a su contenido de nifedipino (n=3) por HPLC. El contenido en principio activo debe estar comprendido entre 90-110%.

2.- Estabilidad física:

a) *Aspecto y propiedades organolépticas de las microemulsiones múltiples o/a/o:* se evalúan los cambios en el aspecto, color y olor de las muestras tomadas a los distintos tiempos y se comparan con la muestra estudiada al comienzo del estudio. Las muestras se consideran estables siempre que presenten aspecto, color y olor característico.

b) *pH:* se evalúan los cambios de pH de las microemulsiones múltiples o/a/o a cada tiempo de estudio mediante el empleo de un pHmetro Crison micro pH 2002.

c) *Tamaño de gotícula de la fase interna (Ø):* se determina el tamaño de las gotículas constituyentes de la fase interna de las muestras tomadas a distintos tiempos mediante PCS, siguiendo la misma metodología que en secciones anteriores. Las muestras se consideran estables siempre que el tamaño de gotícula sea inferior a 300 nm.

d) *Comportamiento reológico y viscosidad:* se evalúa la reología y se determinan

los valores de viscosidad de las muestras tomadas a los distintos tiempos, siguiendo la misma metodología que en secciones anteriores. Los sistemas dispersos se consideran estables siempre que presenten valores bajos que no afecten a su integridad física.

- Resultados y comentarios:

En las tablas 34 a 37 se resumen los resultados obtenidos en los estudios de estabilidad realizados sobre las microemulsiones múltiples de nifedipino:

Parámetro analizado	Tiempo (meses)			
	0	1	3	6
<i>Aspecto, color y olor</i>	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
<i>Valor de pH</i>	6,49±0,07	6,56±0,01	6,53±0,05	6,47±0,11
<i>Radio hidrodinámico (nm)</i>	53,48±8,31	46,53±12,11	48,87±9,87	61,92±17,18
<i>Reología y viscosidad (D·s·cm⁻²)</i>	Newtoniano 0,389±0,025	Newtoniano 0,401±0,023	Newtoniano 0,472±0,034	Newtoniano 0,443±0,051
<i>Contenido en nifedipino (%)</i>	96,05±0,79	100,53±0,29	97,13±0,14	97,74±1,23

Tabla 34. Resultados del estudio de estabilidad de las microemulsiones múltiples o/a/o (microemulsión primaria (o/a)/Brij®96/PG/IPM) a 4°C y 60% HR.

Parámetro analizado	Tiempo (meses)			
	0	1	3	6
<i>Aspecto, color y olor</i>	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
<i>Valor de pH</i>	6,49±0,07	6,58±0,04	6,47±0,05	6,45±0,01
<i>Radio hidrodinámico (nm)</i>	53,48±8,31	64,03±13,9	56,52±9,79	42,34±14,71
<i>Reología y viscosidad (D·s·cm⁻²)</i>	Newtoniano 0,389±0,025	Newtoniano 0,410±0,011	Newtoniano 0,425±0,029	Newtoniano 0,393±0,062
<i>Contenido en nifedipino (%)</i>	96,05±0,79	96,50±0,15	97,25±1,09	98,81±0,89

Tabla 35. Resultados del estudio de estabilidad de las microemulsiones múltiples o/a/o (microemulsión primaria (o/a)/Brij®96/PG/IPM) a 25°C.

Parámetro analizado	Tiempo (meses)			
	0	1	3	6
<i>Aspecto, color y olor</i>	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
<i>Valor de pH</i>	6,49±0,07	6,50±0,04	6,39±0,02	6,18±0,03
<i>Radio hidrodinámico (nm)</i>	53,48±8,31	40,27±17,57	47,49±12,56	58,15±10,26
<i>Reología y viscosidad (D·s·cm⁻²)</i>	Newtoniano 0,389±0,025	Newtoniano 0,511±0,047	Newtoniano 0,489±0,032	Newtoniano 0,417±0,028
<i>Contenido en nifedipino (%)</i>	96,05±0,79	97,43±0,36	99,86±0,19	92,34±0,67

Tabla 36. Resultados del estudio de estabilidad de las microemulsiones múltiples o/a/o (microemulsión primaria (o/a)/Brij®96/PG /IPM) a 30°C y 60% HR.

Parámetro analizado	Tiempo (meses)			
	0	1	3	6
<i>Aspecto, color y olor</i>	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
<i>Valor de pH</i>	6,49±0,07	6,33±0,03	6,24±0,04	6,02±0,02
<i>Radio hidrodinámico (nm)</i>	53,48±8,31	69,03±17,76	65,58±10,79	65,58±10,79
<i>Reología y viscosidad (D·s·cm⁻²)</i>	Newtoniano 0,389±0,025	Newtoniano 0,498±0,062	Newtoniano 0,343±0,051	Newtoniano 0,451±0,051
<i>Contenido en nifedipino (%)</i>	96,05±0,79	102,06±0,74	97,99±0,15	90,68±0,82

Tabla 37. Resultados del estudio de estabilidad de las microemulsiones múltiples o/a/o (microemulsión primaria (o/a)/Brij®96/PG /IPM) a 40°C y 75% HR.

Los resultados obtenidos demuestran la gran estabilidad de las formulaciones ensayadas, ya que todos los parámetros evaluados presentan valores dentro de los límites establecidos para la formulación al final del estudio.

Según los resultados obtenidos se observa, durante el estudio de estabilidad, leves anomalías con respecto a los valores de pH. A las condiciones de 30°C/60% HR y 40°C/75% de HR se producen ligeras modificaciones de este parámetro en los sistemas dispersos a partir del tercer y primer mes de estudio, respectivamente. Por lo tanto, las alteraciones en los valores de pH se producen de manera más prematura en las condiciones más drásticas del estudio de estabilidad. Este fenómeno podría deberse a la liberación de una mínima cantidad de ácidos grasos libres relacionado con algún fenómeno de descomposición de los componentes oleosos de la formulación.

Por otro lado se aprecia, que para las condiciones más drásticas del estudio de estabilidad, 30°C/60% HR y 40°C/75% de HR, se produce una ligera inestabilidad química con pérdidas del principio activo comprendidas, aproximadamente, entre el 4 y 5%, respectivamente. Aunque en ambos casos el contenido del principio activo se encuentra dentro de los límites establecidos.

5.4.8.- Estabilidad de las microemulsiones múltiples o/a/o frente a los ciclos de congelación y descongelación

Se trata de un estudio de estabilidad muy característico de las microemulsiones que, se realiza con el fin de evaluar la integridad física y química de las microemulsiones múltiples cargadas de nifedipino, constituidas por microemulsión primaria (o/a)/ Brij® 96/PG/IPM, en las condiciones de máximo estrés térmico.

- Método:

Para realizar el estudio se somete al sistema disperso objeto de estudio a ciclos alternos, de 24 horas de congelación (-40°C), y descongelación (40°C) durante 7 días. Este ensayo se realiza por triplicado (n=3). Se toman muestras inicialmente y a los 7 días sobre las que se evalúan los siguientes parámetros:

1.- Estabilidad química:

Se preparan soluciones metabólicas, con una concentración de 10 µg/ml, de las muestras tomadas a los distintos tiempos, se filtran por 0,45 µm y valoran respecto a su contenido de nifedipino (n=3) por HPLC. El contenido en principio activo debe estar comprendido entre 90-110%.

2.- Estabilidad física:

Se evalúan los cambios en el tamaño de gotícula de la fase interna, reología y viscosidad, aspecto (color, olor, transparencia e isotropía óptica) y pH de las microemulsiones múltiples de nifedipino, comparándolos con los resultados observados en las muestras estudiadas al comienzo del ensayo.

Las microemulsiones múltiples o/a/o se consideran estables siempre que presenten un tamaño medio de gotículas inferior a 300 nm, comportamiento reológico newtoniano y baja viscosidad, valores de pH similares a los que presenta el sistema disperso al inicio del estudio, color amarillo, olor característico y aspecto transparente y ópticamente isótropo.

- Resultados y comentarios:

Los resultados obtenidos en el estudio de estabilidad de las microemulsiones múltiples sometidas a ciclos de congelación y descongelación se reflejan en la tabla 38. Como se puede observar, no existen modificaciones significativas en los resultados de los parámetros evaluados al finalizar el estudio. Por lo tanto, las microemulsiones

múltiples objeto de estudio se mantienen física y químicamente estables al finalizar los ciclos de congelación y descongelación, confirmandose de esta manera la gran estabilidad tanto del principio como de la formulación en situaciones extremas de estrés térmico.

Tiempo (días)	Parámetro analizado				
	<i>Aspecto, color y color</i>	<i>Valor de pH</i>	<i>Reología y viscosidad (D.s. cm⁻²)</i>	<i>Contenido en nifedipino (%)</i>	<i>Radio hidrodinámico (nm)</i>
0	Cumple	5,53±0,04	Newtoniano 0,376±0,051	96,05±0,79	53,48±8,31
7	Cumple	5,48±0,03	Newtoniano 0,295±0,042	97,35±0,32	61,24±11,49

Tabla 38. Resultados del estudio al test de centrifugación de las microemulsiones múltiples o/a/o (microemulsión primaria (o/a)/Brij® 96/PG/IPM) de nifedipino a los ciclos de congelación y descongelación.

5.4.9.- Estabilidad de las microemulsiones múltiples o/a/o en el test de centrifugación

Este estudio tuvo como objeto la evaluación de la integridad física y química de las múltiples microemulsiones de nifedipino cuando son expuestas a la acción de una fuerza centrífuga.

- Método:

La microemulsiones múltiples o/a/o de nifedipino objeto de estudio se someten a centrifugación durante 20 minutos a una velocidad de 9.000 g. Este ensayo se realiza por triplicado (n=3). Se toman muestras al comienzo y al final del estudio sobre las que se evalúan los siguientes parámetros:

1.- Estabilidad química:

Se preparan soluciones metanólicas, con una concentración de 10 µg/ml, de las muestras tomadas a los distintos tiempos, se filtran por 0,45 µm y valoran respecto a su contenido de nifedipino (n=3) por HPLC. El contenido en principio activo debe estar comprendido entre 90-110%.

2.- Estabilidad física:

Se evalúan los cambios en el tamaño de gotícula de la fase interna, reología y viscosidad, aspecto (color, olor, transparencia e isotropía óptica) y pH de las microemulsiones múltiples de nifedipino, comparándolos con los resultados observados en las muestras estudiadas al comienzo del ensayo. Las microemulsiones se consideran estables siempre que presenten un tamaño medio de gotículas inferior a 300 nm, comportamiento reológico newtoniano y baja viscosidad, valores de pH similares a los

que presenta el sistema disperso al inicio del estudio, color amarillo y olor característico, así como un aspecto transparente y ópticamente isótropo.

- Resultados y comentarios:

Las muestras analizadas resultan ser física y químicamente estables al test de centrifugación, no produciéndose modificaciones significativamente importantes en los parámetros evaluados, tal y como se refleja en la tabla 39:

<i>Tiempo</i>	<i>Parámetro analizado</i>				
	<i>Aspecto y color</i>	<i>Valor de pH</i>	<i>Reología y viscosidad (D.s. cm⁻²)</i>	<i>Contenido en nifedipino (%)</i>	<i>Radio hidrodinámico (nm)</i>
<i>Inicio</i>	Cumple	5,49±0,07	Newtoniano 0,389±0.025	96,05±0,79	53,48±8,31
<i>Final</i>	Cumple	5.57±0,01	Newtoniano 0,306±0.031	96,37±0,23	49,97±7,03

Tabla 39. Resultados del estudio al test de centrifugación de las microemulsiones múltiples o/a/o (microemulsión primaria (o/a)/Brij® 96/PG/IPM) de nifedipino.

CAPÍTULO VI. ESTUDIOS DE ABSORCIÓN TRANSDÉRMICA DE NIFEDIPINO

VI.- ESTUDIOS DE ABSORCIÓN TRANSDÉRMICA DE NIFEDIPINO

El diseño y desarrollo galénico de nuevos sistemas de liberación de fármacos con el fin de incrementar la eficacia de los mismos constituye un tema de actualidad en la investigación farmacéutica, como lo demuestra el gran número de trabajos publicados sobre este tema. En la última década, muchos de los trabajos basados en el desarrollo de sistemas de liberación controlada se han enfocado en la formulación de microemulsiones, que se caracterizan por ser sistemas isotrópicos transparentes o ligeramente opalescentes con estabilidad infinita.

Por otra parte, las formas convencionales de nifedipino (comprimidos y cápsulas) existentes en el mercado para su administración por vía oral y sublingual requieren de la administración de al menos tres dosis al día, y en el caso de las formas de liberación sostenida de dos dosis al día, debido al intenso efecto de primer paso que sufre el nifedipino a nivel hepático y a su corta semivida plasmática. Además, es frecuente la aparición de distintos efectos adversos entre los que se incluyen dolor de cabeza, rubor, vértigos y edema en el tobillo asociados a niveles plasmáticos elevados del fármaco. El incumplimiento posológico constituye otro de los inconvenientes de las formas farmacéuticas convencionales de nifedipino debido a la larga duración de los tratamientos para los que se encuentran indicadas (angina de pecho, hipertensión y otros trastornos cardiovasculares).

Todos estos factores, junto con el hecho de que el nifedipino requiere de dosis diarias bajas (20-60 mg), hacen posible que este principio activo pueda ser un candidato idóneo para el desarrollo de un sistema transdérmico efectivo para su administración durante un intervalo de tiempo comprendido entre 2 y 5 días. Este tipo de formulaciones evita el intenso efecto de primer paso que sufre el fármaco a nivel hepático, mantiene niveles plasmáticos uniformes, reduce los efectos adversos y facilita el cumplimiento posológico.

El objetivo principal de este apartado es estudiar la liberación in vitro del nifedipino a partir de las microemulsiones múltiples desarrolladas y seleccionadas en el capítulo V de la presente memoria. Además, se evalúa el efecto de la incorporación del principio activo en la fase externa, interna o en ambas de las microemulsiones múltiples o/a/o, y la posible influencia de la composición del vehículo sobre los perfiles de cesión del nifedipino a través de membranas artificiales y piel abdominal de rata.

Por último, para determinar la utilidad de estos sistemas dispersos se comparan sus perfiles de difusión con los obtenidos a partir de microemulsiones o/a y a/o.

6.1.- Estudios de cesión in vitro de nifedipino a través de membrana artificial de PVDF desde microemulsiones múltiples o/a/o constituidas por microemulsión primaria o/a, Brij® 96, PEG 400 y IPM

Este estudio se realiza con el fin de determinar el perfil de cesión de la microemulsión múltiple o/a/o seleccionada (20% microemulsión primaria, 30% Brij® 96/ PEG 400 y IPM), el efecto de la incorporación del principio activo en la fase interna

y externa de este sistema disperso sobre la cesión del principio activo a través de la membrana artificial, y la posible influencia en la composición del vehículo en la difusión del fármaco desde la propia formulación. Las membranas artificiales se han utilizado en numerosos trabajos en estudios de preformulación de numerosos fármacos, y sirven para seleccionar de manera preliminar entre las distintas formulaciones desarrolladas. Además, en nuestro estudio se determinan una serie de parámetros (coeficiente de permeabilidad, flujo, cantidad cedida, etc.) con el fin de explicar y evaluar la absorción del nifedipino a través de la membrana artificial.

6.1.1.- Preparación de las microemulsiones

En este apartado se desarrollan distintos tipos de microemulsiones múltiples o/a/o (microemulsión primaria o/a/ Brij® 96, PEG 400 y IPM) con variaciones en la cantidad de principio activo incorporada y composición cuantitativa de los componentes que la constituyen:

a) Microemulsiones múltiples o/a/o con distintas cantidades de principio activo incorporadas en la fase externa.

b) Microemulsiones múltiples o/a/o con variaciones en la relación Brij® 96 /PEG 400.

c) Microemulsiones múltiples o/a/o con variaciones en el contenido total Brij® 96 /PEG 400.

d) Microemulsiones múltiples o/a/o con variaciones en el contenido total de fase interna.

Otro punto importante de este estudio es el desarrollo de microemulsiones o/a y a/o con la misma composición cuantitativa y cualitativa que una múltiple microemulsión o/a/o, con el fin de comparar los perfiles de difusión y determinar las diferencias existentes entre estos sistemas dispersos.

- Método:

El desarrollo galénico las microemulsiones múltiples o/a/o formuladas en esta sección, así como la incorporación del principio activo en la fase interna y externa se describe detalladamente en el *apartado 5.3* de la presente memoria. El superíndice “*” utilizado en la notación de todas las microemulsiones múltiples indica la presencia de nifedipino en la fase interna, externa ó ambas de la microemulsión múltiple o/a/o. Todas las microemulsiones múltiples o/a/o presentan la misma composición cualitativa de fase interna (microemulsión primaria o/a).

La cantidad incorporada a la microemulsión primaria o/a se mantiene siempre constante a una concentración de 18 mg ml^{-1} , por lo que las variaciones del contenido del principio activo dentro de las microemulsiones múltiples, sin tener en cuenta la

concentración de nifedipino presente en la fase externa, dependerá de la cantidad (en peso) de fase interna incorporada.

a) Para examinar el efecto de la incorporación de nifedipino en la fase externa de la múltiple microemulsión o/a/o de nifedipino seleccionada (microemulsión primaria o/a/ Brij® 96/PEG 400/IPM; 20/30/50, p/p/p a una relación fija tensioactivo/cotensioactivo 3:1 (p/p)) sobre su perfil de cesión, se procede a la incorporación de las siguientes cantidades de nifedipino en la fase externa (IPM): 0, 4 y 8 mg de nifedipino que corresponden respectivamente a las concentraciones de 0, 0,8 y 1,6 mg·ml⁻¹.

La concentración de nifedipino presente en la fase interna se mantuvo constante a 18 mg·ml⁻¹. Como formulación control se desarrolla la misma microemulsión múltiple con la máxima concentración de nifedipino presente en la fase externa (1,6 mg·ml⁻¹).

b) En el desarrollo galénico de microemulsiones múltiples o/a/o en las que se modifica la relación tensioactivo/cotensioactivo no es posible mantener la proporción de los componentes que constituyen la microemulsión múltiple seleccionada. Para llevar a cabo este estudio, se emplean microemulsiones múltiples constituidas por un 15% en peso de microemulsión primaria o/a, 25% en peso de Brij® 96/PEG 400 y 60% en peso de IPM con una relación tensioactivo/cotensioactivo de 2:1 a 4:1.

La concentración de nifedipino incorporada en la fase interna y externa se mantiene constante siendo de 18 mg·ml⁻¹ y de 0,8 mg·ml⁻¹, respectivamente.

c) En el desarrollo galénico de microemulsiones múltiples con variación en el contenido total Brij® 96/PEG 400 a una proporción fija 3:1 (p/p) no es posible mantener la proporción de fase interna de la múltiple microemulsión o/a/o seleccionada. Para llevar a cabo este estudio, se seleccionan microemulsiones múltiples constituidas por un 10% en peso de fase interna y una proporción variable de Brij® 96/PEG 400 comprendida entre 20 y 50% en peso.

La concentración de nifedipino incorporada en la fase interna y externa se mantiene constante siendo de 18 mg·ml⁻¹ y de 0,8 mg·ml⁻¹, respectivamente.

d) En el desarrollo galénico de microemulsiones múltiples o/a/o con variación en el contenido en fase interna, se mantiene constante la proporción tensioactivo/cotensioactivo (30%, en peso) a la misma relación (3:1) que la microemulsión múltiple o/a/o seleccionada. El contenido en fase interna incorporado en los sistemas dispersos (microemulsión primaria o/a) está comprendido entre el 5 y 20% en peso.

La concentración de nifedipino incorporada en la fase externa se mantiene constante a 0,8 mg·ml⁻¹. La cantidad de principio activo presente en la fase interna depende del porcentaje de ésta incorporado en la microemulsión múltiple, siendo la concentración de nifedipino de 18 mg·ml⁻¹.

En el estudio comparativo de microemulsiones múltiples o/a/o y microemulsiones o/a y a/o se seleccionan sistemas dispersos con la siguiente composición: 10% fase interna

(microemulsión primaria, IPM o agua), 30% Brij® 96/PEG 400 y 60% de fase externa (IPM o agua).

6.1.2.-Determinación de los coeficientes de reparto

La determinación de los coeficientes de reparto es de vital importancia ya que permiten, por un lado, determinar si es posible formular el nifedipino en sistemas dispersos constituidos por una fase acuosa y otra oleosa y decidir en cual de ellas irá incorporado, y por otro lado, dar una explicación a los fenómenos de difusión del principio activo desde cada una de las formulaciones desarrolladas

- Método:

Se determinan los siguientes coeficientes de reparto:

a) Coeficiente de reparto octanol/tampón fosfato (pH=7,4) (P_{oct}) y octanol/agua destilada ($P_{oct/agua}$): para la determinación del coeficiente de reparto del principio activo se sigue el método propuesto por Schmalfuß y cols. (1997). Se parte de una mezcla de volúmenes iguales de octanol y fase acuosa (tampón fosfato USP 23 pH=7,4 ó agua) que se somete a agitación en vórtex hasta alcanzar el equilibrio (saturación de ambas fases). Posteriormente, se añade a la mezcla una cantidad conocida (25 mg) de principio activo, y se somete todo el sistema a agitación en vórtex durante 5 minutos a 2000 r.p.m.

Finalmente, se procede a la separación de ambas fases mediante centrifugación de la mezcla a 8000 g durante 5 minutos, transcurridos los cuales se determina la cantidad de nifedipino presente en cada una de las fases, y se calculan los coeficientes de reparto mediante la ecuación de Nernst:

$$P_{oct} = a_{org}/a_{aq}$$

donde a_{aq} y a_{org} son las concentraciones de nifedipino en la fase acuosa y en la fase orgánica, respectivamente.

b) Coeficientes de reparto IPM/tampón fosfato pH=7,4 (P_{IPM}) y IPM/agua ($P_{oct/agua}$): los coeficientes de reparto IPM/tampón fosfato pH=7,4 y IPM/agua se determinan de forma similar a la descrita en el punto a) de este apartado.

c) Coeficientes de reparto del nifedipino en IPM/agua en presencia propilenglicol (cotensioactivo de microemulsión o/a) y distintas cantidades de PEG 400 en función de la relación Brij 96/PEG 400 presente en las microemulsiones múltiples o/a/o objeto de estudio: se adicionan distintos porcentajes de PEG 400 (8,33%, 6,25% y 5% v/v) correspondientes a la relación Brij 96/PEG 400 2:1, 3:1 y 4:1 de la microemulsión múltiple a 17,55 ml de la fase externa de la microemulsión múltiple (IPM), y a 3,75 ml de la mezcla IPM, propilenglicol y agua según las proporciones de la microemulsión primaria o/a (15% IPM, 30% Brij® 96/propilenglicol y 55% IPM a una proporción fija tensioactivo/cotensioactivo 2:1 (p/p)).

Con el fin de evaluar el efecto del PEG 400 en la partición del nifedipino en las múltiples microemulsiones o/a/o, se procede conforme a lo comentado anteriormente pero sin la adición de PEG 400 al sistema.

Una vez preparados todos los sistemas, se adiciona un exceso de fármaco y se someten a agitación hasta alcanzar el equilibrio entre las dos fases. Después, todos las muestras se centrifugan a 8000 g durante 5 minutos con el fin de separar ambas fases. Se determina la concentración de nifedipino en las mismas y se calcula el coeficiente de reparto. En todos los casos se mantiene la composición cuantitativa y cualitativa de las formulaciones desarrolladas en el apartado 6.1.1.

d) Coeficientes de reparto de nifedipino en IPM/agua en presencia de propilenglicol (cotensioactivo de microemulsión o/a) y distintas cantidades de PEG 400 en función del contenido total Brij 96/PEG 400, a una relación fija 3:1, presente en las microemulsiones múltiples o/a/o objeto de estudio: los ensayos se realizan a partir de microemulsiones múltiples constituidas por un 10% en peso de fase interna (microemulsión primaria o/a), y una proporción variable de Brij® 96/PEG 400, a una relación fija 3:1, comprendido entre el 20 y el 50% en peso.

Se adicionan distintos porcentajes de PEG 400 (5%, 7,5%, 10% y 12,5% v/v) correspondientes al contenido total Brij® 96/PEG 400 del 20, 30, 40 y 50% en peso presente en la microemulsión múltiple, a distintas cantidades de fase externa del sistema disperso (IPM), comprendidas entre 20,5-17,5 ml, y a 2,5 ml de la mezcla IPM, propilenglicol y agua según las proporciones de la microemulsión primaria (15% IPM, 30% Brij® 96/propilenglicol y 55% IPM a una proporción fija tensioactivo/cotensioactivo 2:1 (p/p)). Se mantiene en todos los casos, la composición cuantitativa y cualitativa de las formulaciones desarrolladas en el apartado 6.1.1. La determinación de los coeficientes de reparto del nifedipino se realiza según lo descrito anteriormente.

e) Coeficientes de reparto de nifedipino en IPM/agua en presencia de PEG 400 (cotensioactivo múltiple microemulsión o/a/o), y en función de la cantidad de fase interna incorporada a la microemulsión múltiple o/a/o: los ensayos se realizan a partir de microemulsiones múltiples constituidas por 30% Brij® 96/PEG 400 a una relación fija (3:1 p/p), y una proporción variable de fase interna (microemulsión primaria o/a) dentro del intervalo comprendido entre el 5 y el 20% en peso.

Se adicionan las siguientes cantidades de fase interna (microemulsión primaria o/a sin tensioactivo): 1,25, 2,5, 3,75 y 5 ml a 1,67 ml de PEG 400 a distintas cantidades de fase externa de la microemulsión múltiple (IPM): 19,3, 17,5, 16,1 y 14,6 ml. Se mantienen, en todos los casos la composición cuantitativa y cualitativa de las formulaciones desarrolladas en el apartado 6.1.1. La determinación de los coeficientes de reparto del nifedipino se realiza según lo descrito anteriormente.

- Resultados y comentarios:

La tabla 40 muestra los coeficientes de reparto del principio activo en distintos sistemas:

<i>Composición cualitativa</i>	<i>Coefficientes de partición (P) (n=3)</i>
Octanol/tampón fosfato (0,2 M pH=7,4)	$P_{oct / \text{tampón fosfato}} = 413,78 \pm 3,81$
Octanol/agua	$P_{oct / \text{agua}} = 315,72 \pm 3,46$
IPM/tampón fosfato (0,2 M pH=7,4)	$P_{IPM} = 37,38 \pm 2,06$
IPM/agua	$P_{IPM / \text{agua}} = 52,41 \pm 1,97$
IPM/agua/propilenglicol	$P_{cos} = 4,33 \pm 0,69$
IPM/agua/propilenglicol/PEG 400 (8,33% v/v)	$P_{2:1 \text{ Brij® 96/PEG 400}} = 0,99 \pm 0,06$
IPM/agua/propilenglicol/PEG 400 (6,25% v/v)	$P_{3:1 \text{ Brij® 96/PEG 400}} = 2,92 \pm 0,33$
IPM/agua/propilenglicol/PEG 400 (5% v/v)	$P_{4:1 \text{ Brij® 96/PEG 400}} = 4,14 \pm 0,29$
IPM/agua/propilenglicol/PEG 400 (5% v/v)	$P_{20\% \text{ Brij® 96/PEG 400}} = 1,59 \pm 0,36$
IPM/agua/propilenglicol/PEG 400 (7,5% v/v)	$P_{30\% \text{ Brij® 96/PEG 400}} = 0,84 \pm 0,12$
IPM/agua/propilenglicol/PEG 400 (10% v/v)	$P_{40\% \text{ Brij® 96/PEG 400}} = 0,41 \pm 0,11$
IPM/agua/propilenglicol/PEG 400 (12,5% v/v)	$P_{50\% \text{ Brij® 96/PEG 400}} = 0,26 \pm 0,07$
IPM/agua /propilenglicol (5% v/v fase interna)/PEG 400	$P_{5\% \text{ fase interna}} = 0,16 \pm 0,02$
IPM/agua/propilenglicol (10% v/v fase interna)/PEG 400	$P_{10\% \text{ fase interna}} = 0,80 \pm 0,31$
IPM/agua/propilenglicol (15% v/v fase interna)/PEG 400	$P_{15\% \text{ fase interna}} = 2,17 \pm 1,02$
IPM/agua/propilenglicol (20% v/v fase interna)/PEG 400	$P_{20\% \text{ fase interna}} = 3,24 \pm 1,33$

Tabla 40. Coeficientes de reparto de nifedipino en los sistemas octanol/agua, octanol/tampón fosfato pH=7,4, IPM/agua, IPM/ tampón fosfato pH=7,4 y IPM/agua/propilenglicol/PEG 400 (según la relación y contenido total tensioactivo/cotensioactivo, y la proporción de fase interna de las microemulsiones múltiples o/a/o).

El nifedipino es una molécula que no se encuentra en estado ionizado a pH fisiológico. La solubilidad en agua del nifedipino es de $2,4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ y su solubilidad en octanol es de $7,3 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Los coeficientes de reparto en octanol/agua y octanol/tampón fosfato (0,2 M pH=7,4) determinados (Tabla 40) presentan valores de $\log P$ de 2,50 y 2,62, respectivamente. Estos valores están en concordancia con los obtenidos por otros autores en otros trabajos experimentales (McDaid y Deasy, 1996).

Existe un valor óptimo de $\log P$ para la mayoría de los compuestos que particionan a través de membranas lipófilas. Así, se ha comprobado que compuestos con valores bajos de $\log P$ no atraviesan el estrato córneo, mientras que aquellos con altos valores de $\log P$ se mantienen disueltos en el estrato córneo. Los valores de $\log P$ obtenidos para el nifedipino, permiten concluir que es una molécula idónea para su absorción efectiva a través de la piel. Estos valores son del mismo orden que los que presentan otras moléculas como el trinitrato de glicerilo (2,05), clordiazepóxido (2,50) y el timolol (1,91). Estos principios activos se absorben a través de la piel alcanzando la circulación sistémica en una extensión y una magnitud adecuada para conseguir un efecto terapéutico.

Los valores altos de los coeficientes de reparto de nifedipino determinados en IPM/agua y IPM/ tampón fosfato pH=7,4, demuestran la lipofilia del nifedipino. Además, permiten suponer que se incorpora en la fase interna de la microemulsión primaria o/a y que particiona posteriormente hacia la fase externa de las microemulsiones múltiples o/a/o.

Como se puede observar en la tabla 40, a medida que aumenta la relación tensioactivo/cotensioactivo y el porcentaje de fase interna incrementa la partición del

principio activo hacia el IPM. En el primer caso, este efecto se puede explicar por la reducción en la incorporación de PEG 400 presente en las formulaciones y en el segundo caso, por una dilución de la concentración de PEG 400, ya que la fase interna (microemulsión primaria o/a) presenta como componente mayoritario agua. El PEG 400 es el responsable de facilitar la partición del principio activo hacia la fase acuosa debido a la elevada solubilidad que presenta en este solvente. Por el contrario, al aumentar el contenido total Brij® 96/PEG 400 incrementa la partición de principio activo hacia la fase acuosa, disminuyendo, por lo tanto, el coeficiente de reparto. Este efecto se debe a un aumento del porcentaje incorporado de PEG 400 al incrementar el contenido total tensioactivo/cotensioactivo.

6.1.3.- Estudios de cesión in vitro

- Método: los estudios de absorción in vitro a través de membranas artificiales se realizan con las microemulsiones múltiples o/a/o desarrolladas en el apartado 6.1.1. En estos estudios se evalúa la influencia de distintos parámetros sobre la absorción de nifedipino:

a) Influencia de la incorporación de distintas cantidades de nifedipino en la fase externa.

b) Influencia de la relación Brij® 96/PEG 400 de las microemulsiones múltiples o/a/o.

c) Influencia del contenido total Brij® 96/PEG 400 de las microemulsiones múltiples o/a/o.

d) Influencia del contenido total de fase interna de las microemulsiones múltiples o/a/o.

- Celda de difusión: los estudios de cesión de nifedipino desde las microemulsiones múltiples o/a/o objeto de estudio, se realizan en una celda de difusión de Franz constituida por un compartimento donador y un compartimento receptor, con un área total disponible para la difusión de 2,06 cm². El volumen total del compartimento receptor es de 12,5 ml y el fluido receptor está constituido por una mezcla tampón fosfato (0,2 M, pH=6,0)/propilenglicol (70/30; v/v) a pH 7,4, con el fin de mantener condiciones sink (Ruan y cols, 1992; Megrab y cols, 1995).

El compartimento receptor se agita a 300 r.p.m y se encuentra termostatzado mediante el paso de agua a través de una doble camisa a 37°C durante todo el experimento. El compartimento donador se sella con parafilm para evitar posibles fenómenos de evaporación, e imitar de esta manera las condiciones in vivo.

Para la realización del experimento se emplea una membrana artificial lipófila de PVDF (difluoropolivinilideno) con un tamaño de poro de 0,2 µm y 0,02 mm de espesor (Shan-Yang, 1996). Antes de iniciar el experimento la membrana se humecta, sumergiéndola en el medio receptor durante 1 hora, y posteriormente se elimina el

exceso de líquido situándola entre dos hojas de papel secante, para facilitar el equilibrio de todo el sistema.

- Muestreo y valoración del nifedipino: Se toman 0,75 ml de muestra del compartimento receptor a la 1, 2, 4, 6, 8, 24, 30 y 48 horas y se reemplaza con el mismo volumen de fluido receptor (tampón fosfato (0,2 M; pH=6,0)/propilenglicol (70/30; v/v)). La cesión del nifedipino desde las formulaciones objeto de estudio a través de la membrana artificial se evalúa durante 48 horas y la concentración del fármaco en las muestras tomadas a distintos tiempos se determina por espectrofotometría UV/Visible a la $\lambda=237,5$, utilizando como blanco el medio receptor.

Todo el sistema se protege de la luz durante el tiempo que dura el ensayo, así como en la lectura de las muestras con el fin de evitar la degradación del principio activo. Los ensayos se realizan por cuadruplicado ($n=4$).

- Tratamiento de datos: los valores del flujo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) en cada intervalo de tiempo de toma de muestra se calculan a partir de la siguiente ecuación (Mahjour y cols., 1990):

$$J = \frac{C \times V_r}{t \times A}$$

donde:

- J ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) es el flujo.
- C ($\mu\text{g}/\text{ml}$) es la concentración del fármaco en el compartimento receptor a cada intervalo de tiempo de toma de muestra.
- V_r (ml) es el volumen del compartimento receptor.
- t (h) es el intervalo de tiempo a la que se toma la muestra.
- A (cm^2) es el área de superficie de la membrana artificial disponible para la difusión.

En todas las formulaciones, el flujo medio en el estado estacionario (J_m) se determina haciendo la media de todos los valores de flujo calculados en cada intervalo de tiempo de muestreo, a partir de la porción lineal del perfil de cesión obtenido al representar la cantidad de nifedipino absorbida por unidad de superficie frente al tiempo.

El coeficiente de permeabilidad (K_p) al final del estudio se calcula mediante la siguiente ecuación (Santoyo y cols, 1996; Gao y Singh, 1998):

$$K_p = \frac{J_m}{C_d}$$

donde:

- K_p ($\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$) es el coeficiente de permeabilidad.

= J_m ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) flujo medio en el estado estacionario.

- C_d (μg) concentración de nifedipino en el compartimento donador.

El tiempo de latencia (t_l) se determina por extrapolación al eje x de la porción lineal de los perfiles obtenidos al representar gráficamente la cantidad de nifedipino absorbida por unidad de superficie frente al tiempo. En el caso de las formulaciones cuya fase externa contiene nifedipino, la determinación del t_l se calcula por extrapolación al eje x de la porción lineal obtenida en el perfil de cesión durante la primera hora de ensayo.

- Análisis estadístico: el análisis estadístico de los resultados experimentales se realiza mediante un análisis de varianza (ANOVA), para determinar la influencia de las distintas microemulsiones múltiples desarrolladas sobre el porcentaje cedido de nifedipino.

- Resultados y comentarios: La cesión de nifedipino desde las microemulsiones múltiples o/a/o se rige principalmente por la transferencia del fármaco desde la fase dispersa a la fase continua, y por la difusión del fármaco a través de la membrana desde la fase continua al medio receptor (condiciones sink).

La difusión de nifedipino desde la fase interna a la externa en las microemulsiones múltiples o/a/o se encuentra influenciada por tres mecanismos posibles:

-1) La formación "in situ" de micelas inversas en las fases oleosas que constituyen el sistema disperso objeto de estudio. La validez de este mecanismo depende de la naturaleza del tensioactivo que forma la micela.

Se ha demostrado que las micelas inversas se forman en la fase oleosa de sistemas dispersos estabilizados por tensioactivos monoméricos, como es el caso del Brij[®] 96 (Sela y cols., 1995). En este caso, el transporte de nifedipino a través de micelas inversas sería uno de los posibles mecanismos que facilitaría la migración del fármaco desde la fase interna oleosa a la fase externa oleosa.

- 2) La presencia de los cotensioactivos (propilenglicol y PEG 400) que forman parte de las microemulsiones desempeñan un papel importante en la cesión del nifedipino desde la microemulsión múltiple o/a/o. Estos solventes facilitan la partición del principio activo desde las distintas fases que constituyen el sistema disperso debido a la alta solubilidad que presenta el nifedipino en los mismos.

- 3) La fuerza conductora que ejerce la fase externa oleosa (IPM) sobre el nifedipino (molécula de marcado carácter lipófilo) localizado en la fase interna oleosa, facilita la partición del principio activo desde la fase oleosa a la acuosa de la microemulsión primaria y posteriormente, hacia la fase dispersa de la microemulsión múltiple o/a/o.

Las diferencias encontradas en las cinéticas de cesión del principio activo desde microemulsiones múltiples o/a/o, con distinta composición cualitativa de los componentes que permiten la formación de las formulaciones, se pueden atribuir a los coeficientes de

reparto de nifedipino entre la fase acuosa y la fase oleosa. No es posible determinar el coeficiente de reparto real del principio activo entre las fases oleosas y la fase acuosa de la microemulsiones múltiple debido a la alta estabilidad de estos sistemas dispersos. Por lo tanto, se determinan los coeficientes de reparto del nifedipino entre la fase acuosa y las fases oleosas en presencia de los cotensioactivos que constituyen la formulación (propilenglicol y PEG 400). Estos coeficientes de reparto se utilizan como una aproximación de la partición del principio activo dentro de la microemulsión múltiple.

a) Influencia de la concentración de nifedipino incorporado en la fase externa sobre la cesión in vitro del principio activo desde microemulsiones múltiples o/a/o.

La figura 93 representa la cantidad cedida acumulada de nifedipino en función del tiempo, desde diferentes microemulsiones múltiples o/a/o constituidas por microemulsión primaria (o/a)/Brij® 96/PEG 400/IPM en proporciones 20/30/50 (p/p/p) con una relación fija Brij® 96/PEG 400 3:1. En todas las formulaciones se mantiene constante la cantidad de principio activo incorporado en la fase interna ya que el porcentaje de esta es el mismo en las microemulsiones múltiples (20 % de fase interna con una concentración de nifedipino de $18 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$), mientras que varía la concentración de nifedipino incorporado en la fase externa.

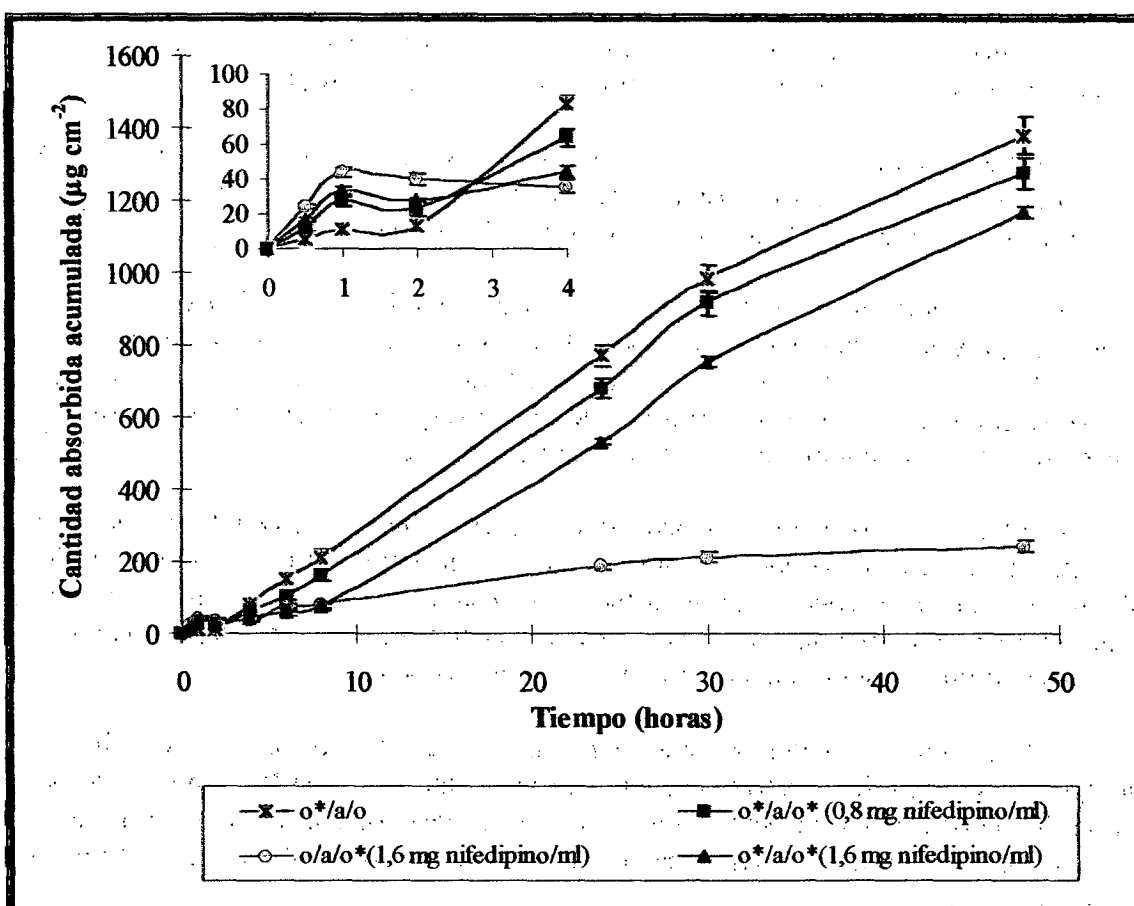


Figura 93. Perfiles de cesión in vitro de nifedipino desde microemulsiones múltiples o/a/o (microemulsión primaria (o/a)/Brij® 96/PEG 400/IPM; 20/30/50, p/p/p) con 36 mg de nifedipino incorporado en fase interna y distintas concentraciones de nifedipino en fase externa (0, 0,8 y $1,6 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$), y una formulación control (microemulsión primaria(o/a)/Brij® 96/PEG 400/IPM; 20/30/50, p/p/p) con $1,6 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ de nifedipino en la fase externa.

Se estudia la incorporación de distintas concentraciones de nifedipino en la fase continua de las microemulsiones múltiples o/a/o con el fin de evaluar el efecto que ejerce el aumento de dicha concentración sobre los perfiles de cesión.

La incorporación de nifedipino en la fase continua (0,8 y 1,6 mg·ml⁻¹ de nifedipino) de las microemulsiones múltiples o*/a/o* favorece la cesión de nifedipino a través de la membrana artificial durante las dos primeras horas de ensayo. La cantidad cedida de nifedipino desde los sistemas dispersos, con 0,8 y 1,6 mg·ml⁻¹ de nifedipino en la fase continua, es del orden de 2,5 y 3,0 veces superior, respectivamente, a la hora de ensayo y 1,8 y 2,1 veces superior, respectivamente, a las dos horas de ensayo respecto a la microemulsión múltiple o*/a/o. Este hecho se debe en el caso de las microemulsiones múltiples o*/a/o* a la rápida difusividad del principio activo, localizado en la fase externa, a través de la membrana hacia el compartimento receptor. Por el contrario, en la microemulsión múltiple o*/a/o el nifedipino tiene que difundir, durante las primeras horas de ensayo, desde la fase interna a la externa del sistema disperso.

A partir de las dos horas hasta la finalización del ensayo existe un aumento de la cesión de nifedipino desde microemulsiones múltiples o*/a/o, en cuanto a velocidad y magnitud, respecto a los sistemas o*/a/o*. A las 24 horas las cantidades cedidas acumuladas de nifedipino desde las microemulsiones múltiples o*/a/o, o*/a/o* (0,8 mg de nifedipino/ml) y o*/a/o* (1,6 mg de nifedipino/ml) son 772,5, 681,6 y 532,2 µg·cm⁻², respectivamente. Mientras que, a las 48 horas de ensayo las cantidades cedidas de nifedipino desde las microemulsiones múltiples o*/a/o, o*/a/o* (0,8 mg de nifedipino/ml) y o*/a/o* (1,6 mg de nifedipino/ml) son 1380,7, 1274,9 y 1167,3 µg·cm⁻², respectivamente.

La mayor cesión de nifedipino desde microemulsiones múltiples o*/a/o se debe a que la fase externa se encuentra totalmente disponible para la solubilización del nifedipino, facilitando la partición hacia la fase continua e incrementando la fuerza de conducción del nifedipino localizado en la fase interna. Todo esto se traduce en una mayor difusión del principio activo a través de la membrana. Lo comentado anteriormente se puede aplicar a las microemulsiones múltiples o*/a/o* (1,6 mg de nifedipino/ml) y o*/a/o* (0,8 mg de nifedipino/ml) para explicar la mayor cesión de principio activo desde aquellos sistemas con mayor disponibilidad de fase externa para la partición del fármaco.

Con el fin de evaluar el efecto reservorio de las microemulsiones múltiples desarrolladas, se estudia la cesión de nifedipino durante las 48 horas que dura el ensayo, y se compara con la cesión de nifedipino desde una formulación control (múltiple microemulsión o/a/o* (1,6 mg de nifedipino/ml)).

Como se puede observar en la figura 93, en las microemulsiones múltiples o*/a/o y o*/a/o* los perfiles de cesión de nifedipino se pueden ajustar a cinéticas de orden cero mientras que, la cesión de nifedipino desde la formulación control se ajusta a una cinética de orden uno.

El distinto comportamiento en la cesión desde los sistemas dispersos o*/a/o y o*/a/o* respecto a la formulación control se debe, por un lado, a que la fase externa

oleosa de la microemulsión múltiple ayuda a la partición del nifedipino desde la fase interna a la externa y por otro lado, al efecto reservorio del principio activo localizado en la fase interna oleosa que permite un gradiente de concentración positivo hacia la fase externa y de aquí al compartimento receptor.

En la tabla 42 se recogen los porcentajes de nifedipino cedidos a las 24 y 48 horas desde las distintas formulaciones:

<i>Formulación</i>	<i>Cantidad cedida (% Dosis)</i>		
	<i>1 h</i>	<i>24 h</i>	<i>48 h</i>
<i>o/a/o* (Control)</i>	11,34 ±1,16	48,08±3,71	62,66 ±4,23
<i>o*/a/o</i>	0,63 ±0,09	42,20±2,98	73,45 ±4,17
<i>o*/a/o* (0,8 mg de nifedipino/ml)</i>	2,54 ±0,29	38,32 ±2,22	66,07 ±3,12
<i>o*/a/o* (1,6 mg de nifedipino/ml)</i>	2,08 ±0,18	24,91 ±1,93	54,64±2,86

Tabla 42. Porcentajes de nifedipino cedidos desde las microemulsiones múltiples o/a/o a distintos tiempos en función de la cantidad de nifedipino incorporado en la fase interna y externa.

Los mayores porcentajes de nifedipino cedidos, en cuanto a magnitud, durante la primera hora de ensayo a través de la membrana de PVDF corresponden a las microemulsiones múltiples con principio activo incorporado en la fase externa. Sin embargo, la formulación control es la que cede mayor porcentaje de la dosis inicial, ya que la difusión del principio activo localizado en la fase externa no se encuentra regulado por la cantidad de nifedipino que difunde desde la fase interna a la externa. Al realizar un análisis estadístico de varianza (ANOVA) para un intervalo de confianza del 95% no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los sistemas dispersos o*/a/o* (0,8 mg de nifedipino/ml) y o*/a/o* (1,6 mg de nifedipino/ml).

A las 24 horas, el mayor porcentaje cedido de nifedipino corresponde a la formulación control. El porcentaje cedido de nifedipino desde las microemulsiones múltiples o*/a/o, o*/a/o* (0,8 mg de nifedipino/ml) y o*/a/o* (1,6 mg de nifedipino/ml) esta comprendido entre el 29,9 y el 42,2%. Al realizar un estudio estadístico (ANOVA) no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes cedidos desde los sistemas dispersos o*/a/o* (0,8 mg de nifedipino/ml) y o*/a/o* (1,6 mg de nifedipino/ml).

A las 48 horas de ensayo, el mayor porcentaje cedido corresponde al sistema disperso o*/a/o. El porcentaje de la dosis administrada que se cede desde las microemulsiones múltiples o*/a/o, o*/a/o* (0,8 mg de nifedipino/ml) y o*/a/o* (1,6 mg de nifedipino/ml) esta comprendido entre el 54,6 y el 73,4%. Al realizar un ANOVA para un intervalo de confianza del 95% no se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre el porcentaje cedido de nifedipino desde los sistemas dispersos o*/a/o y o*/a/o* (0,8 mg de nifedipino/ml).

Como se puede apreciar en los resultados obtenidos a las 24 y 48 horas, aquellos sistemas dispersos con menor saturación de nifedipino en la fase externa ejercen una mayor conducción sobre el principio activo localizado en la fase interna. De esta manera, se genera un gradiente de concentración positivo que se traduce en un incremento del porcentaje cedido de nifedipino

La tabla 43 muestra los coeficientes de permeabilidad y los tiempos de latencia de las microemulsiones múltiples o/a/o objeto.

Microemulsión múltiple	$K_p \cdot 10^3 \text{ (cm} \cdot \text{h}^{-1}\text{)}$	$t_l \text{ (horas)}$
o/a/o* (Control)	10,7±0,295	0,008 ±0,001
o*/a/o	6,84±0,043	0,382 ±0,012
o*/a/o* (0,8 mg de nifedipino/ml)	5,83±0,039	0,048 ±0,003
o*/a/o* (1,6 mg de nifedipino/ml)	3,85±0,022	0,036 ±0,005

Tabla 43. Coeficientes de permeabilidad (K_p) y tiempos de latencia (t_l) de las microemulsiones múltiples o/a/o (microemulsión primaria o/a/Brij® 96/PEG 400/IPM; 20/30/50; p/p/p) en función de la concentración de nifedipino presente en la fase interna y externa.

Los coeficientes de permeabilidad se calculan en el estado estacionario de los perfiles de cesión de cada formulación, considerando la concentración total de fármaco presente en las mismas. Es interesante destacar que los K_p obtenidos desde las microemulsiones múltiples o*/a/o, o*/a/o* (0,8 mg de nifedipino/ml) y o*/a/o* (1,6 mg de nifedipino/ml) están relacionados con la fuerza de conducción que ejerce la fase externa sobre el nifedipino localizado en la fase interna. Por lo tanto, esta fuerza de conducción es mayor en aquellas microemulsiones múltiples con menor saturación de nifedipino en la fase continua dando lugar a un mayor K_p .

La formulación control presenta un valor más alto de K_p debido a que todo el nifedipino localizado en la fase externa está disponible para la absorción, y dicha cesión no está regulada por la presencia de principio activo localizado en la fase interna.

La incorporación de nifedipino en la fase externa de las microemulsiones múltiples disminuye considerablemente el tiempo necesario para que el principio activo atraviese la membrana lipófila y alcance el compartimento receptor. En este tipo de formulaciones, el nifedipino no tiene que difundir desde la fase dispersa a la fase continua para que se produzca la absorción. En la formulación control, el tiempo de latencia es muy pequeño debido a la rápida cesión del principio activo incorporado en la fase externa que, como se ha comentado anteriormente, no se encuentra regulada por la presencia de nifedipino en la fase interna.

La figura 94 representa los flujos de nifedipino desde las microemulsiones múltiples. Como se puede observar, durante la primera hora de ensayo se produce un incremento del flujo en todas las formulaciones. Los mayores valores de flujo se obtienen desde los sistemas dispersos o/a/o* (49,9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) y o*/a/o* (0,8 mg de nifedipino/ml) (25,3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$).

Posteriormente, en todas las microemulsiones múltiples se produce una disminución del flujo. En el caso de la formulación control, el flujo disminuye hasta la finalización del ensayo (5,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) debido a que la dosis incorporada es muy pequeña y no se alcanza el estado estacionario. En las microemulsiones múltiples o*/a/o y o*/a/o* (0,8 mg de nifedipino/ml) se produce una disminución de este parámetro hasta las 2 horas de ensayo con valores de flujo de 6,5 y 1,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, respectivamente. En el caso del sistema disperso o*/a/o* (1,6 mg de nifedipino/ml) el flujo disminuye hasta las 6 horas de ensayo alcanzando valores de 13,8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$.

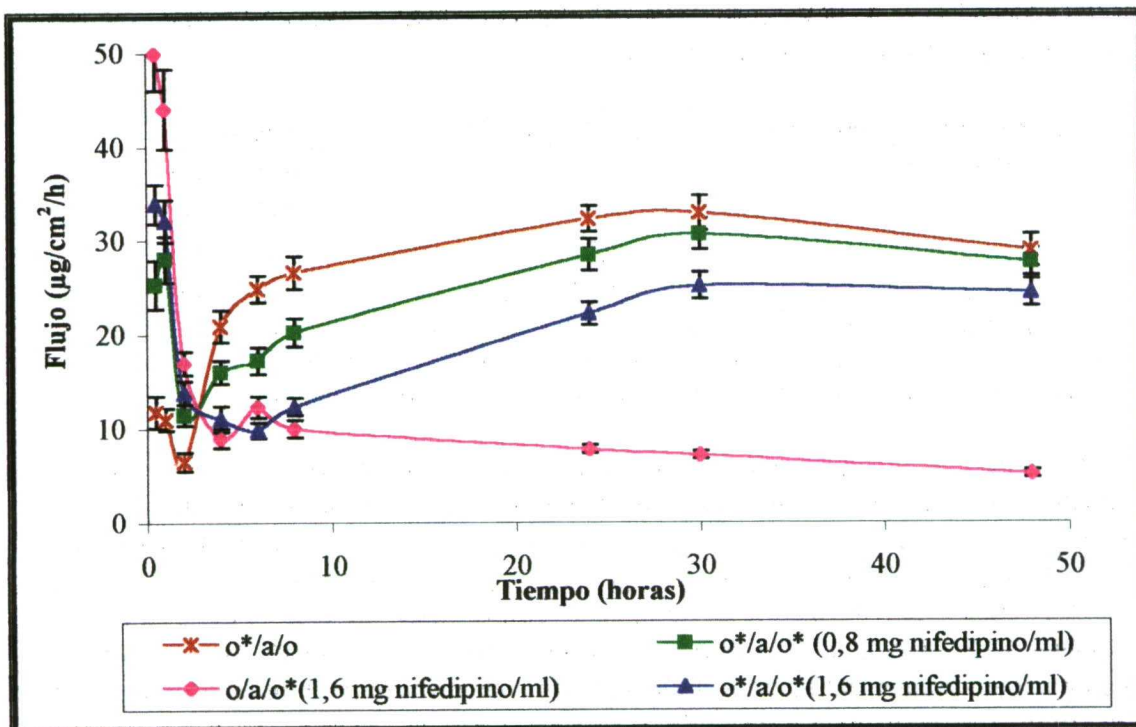


Figura 94. Flujos de nifedipino a través de la membrana PVDF desde las microemulsiones múltiples o*/a/o, o*/a/o* (0,8 mg de nifedipino/ml), o*/a/o* (1,6 mg de nifedipino/ml) y o/a/o* en función del tiempo.

En la microemulsión múltiple o*/a/o el flujo aumenta progresivamente desde las 4 hasta las 30 horas de ensayo (32,8 µg/cm²/h), disminuyendo ligeramente a las 48 horas hasta un valor de 28,8 µg/cm²/h.

En la microemulsión múltiple o*/a/o* (0,8 mg de nifedipino/ml), el flujo aumenta progresivamente desde las 4 hasta las 30 horas de ensayo (30,6 µg/cm²/h), aunque de manera menos acusada que en los sistemas dispersos o*/a/o. A las 48 horas de ensayo, este parámetro disminuye ligeramente hasta valores de 27,6 µg/cm²/h.

Por último, en la microemulsión múltiple o*/a/o* (1,6 mg de nifedipino/ml) el flujo aumenta desde las 8 hasta las 30 horas de ensayo alcanzando un valor máximo de 25,1 µg/cm²/h. Posteriormente, el flujo disminuye ligeramente a las 48 horas de ensayo (24,3 µg/cm²/h).

Los flujos en el estado estacionario para las microemulsiones múltiples o*/a/o, o*/a/o* (0,8 mg de nifedipino/ml), o*/a/o* (1,6 mg de nifedipino/ml), y o/a/o* son de 24,6, 23,2, 16,9 y 8,5 µg/cm²/h.

b) Influencia de la relación Brij® 96/PEG 400 sobre la cesión de nifedipino desde microemulsiones múltiples o/a/o en estudios de absorción in vitro.

La figura 95 muestra la cantidad cedida acumulada de nifedipino desde diferentes microemulsiones múltiples o/a/o constituidas por microemulsión primaria (o/a)/Brij® 96/PEG 400/IPM; 15/25/60, p/p/p) con variación en la relación Brij 96/PEG

400 dentro del intervalo comprendido entre 2:1 y 4:1. Como formulación control se desarrolla la misma microemulsión múltiple en ausencia de cotensioactivo (PEG 400).

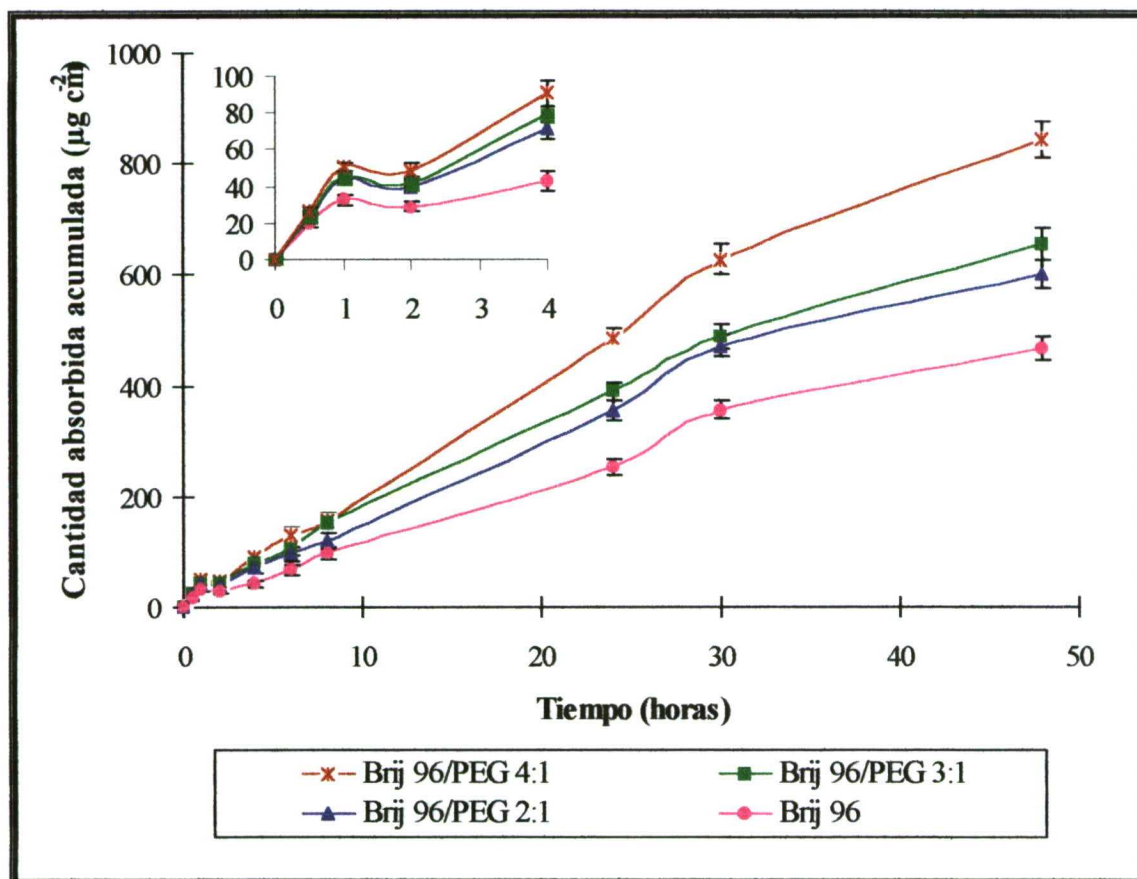


Figura 95. Perfiles de cesión *in vitro* de nifedipino desde microemulsiones múltiples o/a/o (microemulsión primaria (o/a)/Brij® 96/PEG 400/IPM 15/25/60, p/p/p.) con 18 mg·ml⁻¹ de nifedipino en fase interna y 0,8 mg·ml⁻¹ de nifedipino en fase externa en función de la relación Brij® 96/PEG 400.

La concentración de nifedipino presente en la fase interna (18 mg·ml⁻¹) y externa (0,8 mg·ml⁻¹) se mantiene constante en todas las formulaciones. Todas las microemulsiones múltiples presentan el mismo porcentaje de fase interna y externa, por tanto, las cantidades de nifedipino presentes en ambas fases son las mismas.

En este ensayo se evalúa la influencia que ejerce la relación Brij® 96/PEG 400 dentro del intervalo 2:1 y 4:1 sobre la cesión de nifedipino desde microemulsiones múltiples constituidas por 15% en peso de microemulsión primaria (fase interna), 25% en peso de Brij® 96/PEG 400 y 60% en peso de IPM.

Como se puede observar en la figura 95, al aumentar la relación Brij® 96/PEG 400 se incrementa la cantidad de nifedipino que se absorbe a través de la membrana artificial lipófila. Este efecto se observa desde las primeras horas de ensayo, aunque de forma más significativa a medida que transcurre el mismo. Los perfiles de cesión del principio activo que se obtienen desde las microemulsiones múltiples o/a/o se pueden ajustar a cinéticas de orden cero.

En la tabla 44 se muestran los coeficientes de permeabilidad (K_p) de nifedipino desde las microemulsiones múltiples.

Microemulsión múltiple	$K_p \cdot 10^3 \text{ (cm} \cdot \text{h}^{-1})$	IP
Control (sin PEG 400)	$3,51 \pm 0,017$	1
Brij® 96/PEG 400 2:1	$4,85 \pm 0,031$	1,38
Brij® 96/PEG 400 3:1	$5,61 \pm 0,049$	1,59
Brij® 96/PEG 400 4:1	$6,21 \pm 0,052$	1,76

Tabla 44. Coeficientes de permeabilidad (K_p) e incrementos de permeabilidad (IP) de nifedipino desde las microemulsiones múltiples o/a/o (microemulsión primaria o/a/Brij® 96/PEG 400/IPM; 15/25/60; p/p/p) en función de la relación tensioactivo/cotensioactivo.

Los valores de K_p se calculan a partir del flujo obtenido en el estado estacionario, teniendo en cuenta la concentración total de nifedipino presente en los sistemas dispersos ($3,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$). Con el fin de normalizar los datos de permeabilidad para cada microemulsión múltiple con respecto a la formulación control se calcula el incremento de la permeabilidad (IP) según la siguiente ecuación (Moreno y cols., 2000):

$$IP = \frac{K_{p\text{Brij96/PEG400}}}{K_{p\text{control}}}$$

De los datos obtenidos se puede concluir que al aumentar la relación Brij® 96/PEG 400 en las microemulsiones múltiples, incrementa la permeabilidad de nifedipino a través de la membrana artificial lipofílica. El mayor K_p corresponde a la microemulsión múltiple con una relación tensioactivo/cotensioactivo 4:1 que da lugar a un aumento de la permeabilidad de 1,76 veces superior respecto a la formulación control.

Como se puede observar en la figura 96, los K_p de nifedipino obtenidos desde las microemulsiones múltiples objeto de estudio, presentan una buena linealidad respecto a los coeficientes de reparto calculados para cada sistema disperso en función de la relación Brij® 96/PEG 400.

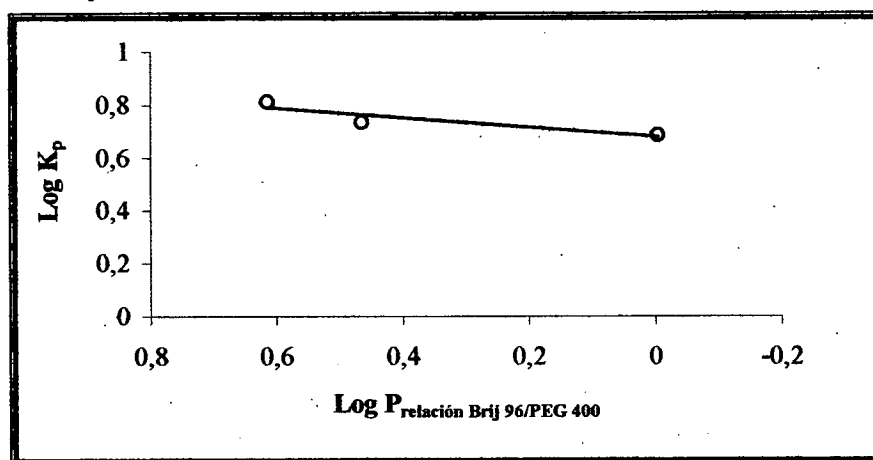


Figura 96. Logaritmos de los coeficientes de permeabilidad a través de la membrana artificial lipofílica desde microemulsiones múltiples o/a/o con variación en la relación Brij® 96/PEG 400 frente a los logaritmos de sus respectivos coeficientes de reparto.

De esta figura se deduce que a medida que aumenta el coeficiente de reparto lo hace la constante de permeabilidad. Por lo tanto, debido a la relación lineal existente entre los K_p y los coeficientes de reparto, las diferencias que existen en las cantidades cedidas de nifedipino desde las distintas microemulsiones múltiples se podrían explicar mediante los coeficientes de reparto del principio activo entre las fases oleosas y la fase acuosa que constituyen los sistemas estudiados.

Los valores de los coeficientes de reparto del nifedipino entre IPM y agua en presencia de PG y PEG 400 según la relación Brij® 96/PEG 400, sugieren que el efecto observado sobre la cesión del nifedipino desde los sistemas dispersos a través de la membrana artificial puede deberse al PEG 400. Esta suposición está reforzada por los resultados de solubilidad del nifedipino en PEG 400 y en sistemas constituidos por Brij® 96/PEG 400 expuestos en el apartado 4.3.6. Así, cuanto menor es la relación tensioactivo/cotensioactivo la partición del nifedipino desde la fase oleosa a la fase acuosa de la microemulsión primaria se ve favorecida por la presencia de una mayor cantidad de PEG 400 en la formulación. Por este mismo motivo, se verá dificultada la posterior partición del nifedipino desde la fase acuosa la fase externa oleosa de la microemulsión múltiple.

No obstante, es interesante destacar que el PEG 400 desempeña un papel fundamental en la partición del nifedipino desde la fase interna oleosa (microemulsión primaria o/a) a la fase externa oleosa para su posterior difusión a través de la membrana. Esto se puede corroborar por el hecho de que en todas las microemulsiones múltiples con una variación en la relación tensioactivo/cotensioactivo, comprendida dentro del intervalo 2:1 a 4:1, se obtienen valores de K_p mayores que la formulación control (sin PEG 400).

En la tabla 45 se muestran los porcentajes de nifedipino cedidos a distintos tiempos desde las microemulsiones múltiples, en función de la relación Brij® 96/PEG 400 presente en las mismas.

Microemulsión múltiple	Cantidad cedida (% Dosis)		
	1 h	24 h	48 h
<i>Control (sin PEG 400)</i>	2,19±0,07	16,55±1,31	30,57±2,46
<i>Brij® 96/PEG 400 2:1</i>	2,90±0,08	23,28±2,59	39,35±2,77
<i>Brij® 96/PEG 400 3:1</i>	2,95±0,10	25,49±2,74	43,78±3,01
<i>Brij® 96/PEG 400 4:1</i>	3,24±0,12	31,76±2,24	55,13±3,36

Tabla 45. Cantidades cedidas (% dosis) de nifedipino desde microemulsiones múltiples o/a/o a distintos tiempos en función de la relación tensioactivo/cotensioactivo.

El porcentaje cedido de la dosis de nifedipino a la primera hora de ensayo desde las microemulsiones múltiples o/a/o está comprendido entre el 2,2 y 3,2%. De las microemulsiones múltiples estudiadas se observa tras realizar un análisis estadístico de varianza (ANOVA) que no existen diferencias significativas entre los porcentajes de nifedipino cedidos desde los sistemas dispersos con una relación Brij® 96/PEG 400 2:1 y 3:1.

A las 24 y 48 horas de ensayo, el mayor porcentaje de nifedipino cedido corresponde a aquellas microemulsiones múltiples con una mayor relación tensioactivo/cotensioactivo, al igual que sucede a la hora de ensayo.

Los porcentajes cedidos de nifedipino a las 24 horas desde los distintos sistemas dispersos están comprendidos entre el 30,6 y 55,1%. Al realizar un ANOVA no se observan diferencias estadísticamente significativas entre las microemulsiones múltiples con una relación Brij® 96/PG 2:1 y 3:1. A las 48 horas, los porcentajes cedidos de nifedipino desde las microemulsiones múltiples están comprendidos entre el 14,6 y 26,3%. Al realizar un análisis estadístico de varianza (ANOVA) no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes cedidos de nifedipino desde los sistemas dispersos con una relación Brij® 96/PG 2:1 y 3:1.

Los tiempos de latencia obtenidos en los distintos sistemas dispersos son muy similares entre sí y están comprendidos entre $2 \cdot 10^{-2}$ y $9 \cdot 10^{-2}$ horas. La explicación de este hecho se debe a que todas las microemulsiones múltiples presentan el mismo porcentaje de fase externa con un contenido de principio activo de $0,8 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$.

La figura 97 representa los flujos de nifedipino desde las microemulsiones múltiples o/a/o con variación en la relación Brij® 96/PEG 400 dentro del intervalo 2:1 a 4:1.

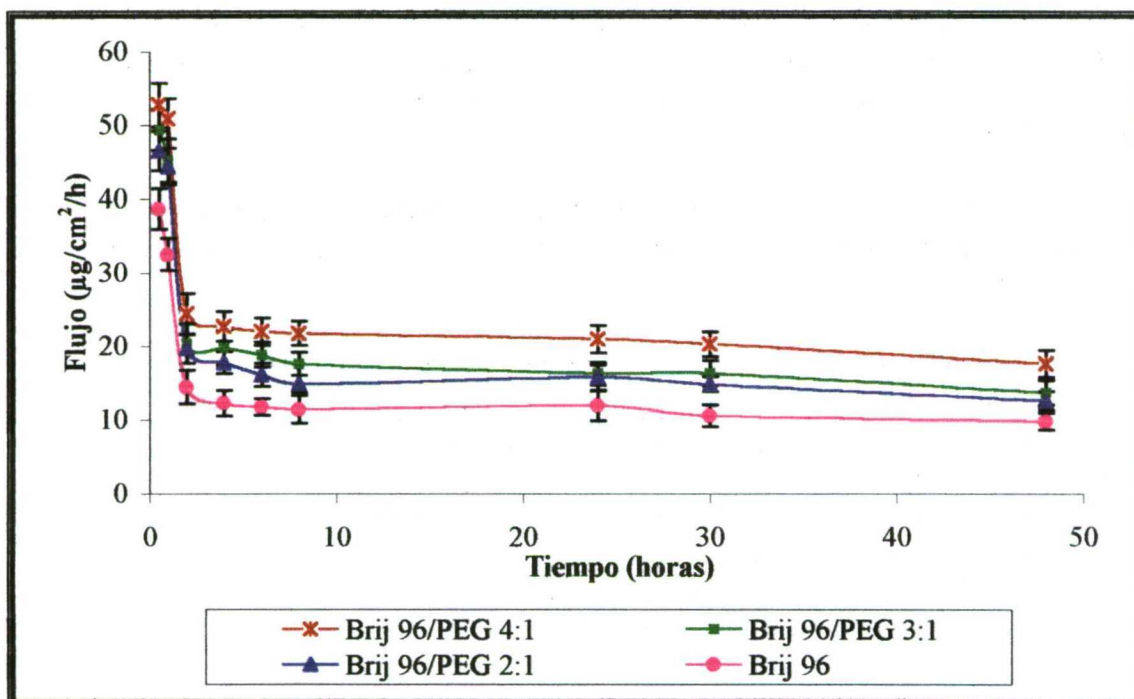


Figura 97. Flujos de nifedipino a través de la membrana PVDF desde microemulsiones múltiples o/a/o (microemulsión primaria (o/a)/Brij® 96/PEG 400/IPM; 15/25/60, p/p/p) con cantidades de nifedipino constantes en la fase interna ($18 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) y fase externa ($0,8 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) en función de la relación Brij® 96/PEG 400.

Los perfiles de flujo de las microemulsiones múltiples estudiadas se caracterizan por un incremento inicial del flujo durante la primera hora de ensayo debido a la rápida cesión de nifedipino localizado en la fase externa. Así, a la hora de ensayo los flujos de

nifedipino obtenidos para las distintas formulaciones están comprendidos entre 38,6 y 52,7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. A las 2 horas de ensayo, se produce una disminución significativa de este parámetro con valores de flujo comprendidos entre 14,4 y 24,4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ para los sistemas dispersos estudiados. Posteriormente, se produce una disminución lenta y progresiva del flujo hasta la finalización del ensayo de cesión con valores de flujo comprendidos entre 9,7 y 17,6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. Aquellas microemulsiones múltiples o/a/o que presentan mayor relación Brij® 96/PEG 400 dan lugar durante todo el ensayo a valores de flujo más altos.

Los flujos en el estado estacionario para las microemulsiones múltiples con una relación Brij® 96/PEG 400 2:1, 3:1, 4:1 y la formulación control (sin PEG 400) son de 15,3, 17,1, 20,4 y 11,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectivamente.

c) Influencia del contenido total Brij® 96/PEG 400 sobre la cesión de nifedipino desde microemulsiones múltiples o/a/o en estudios de absorción in vitro.

La figura 98 muestra la cantidad cedida acumulada de nifedipino desde microemulsiones múltiples o/a/o con un contenido fijo en fase interna (10% microemulsión primaria o/a) y una proporción variable del contenido total de Brij® 96/PEG 400, y por lo tanto de fase externa oleosa, comprendido entre el 20 y el 50% en peso con una relación fija tensioactivo/cotensioactivo 3:1 (p/p).

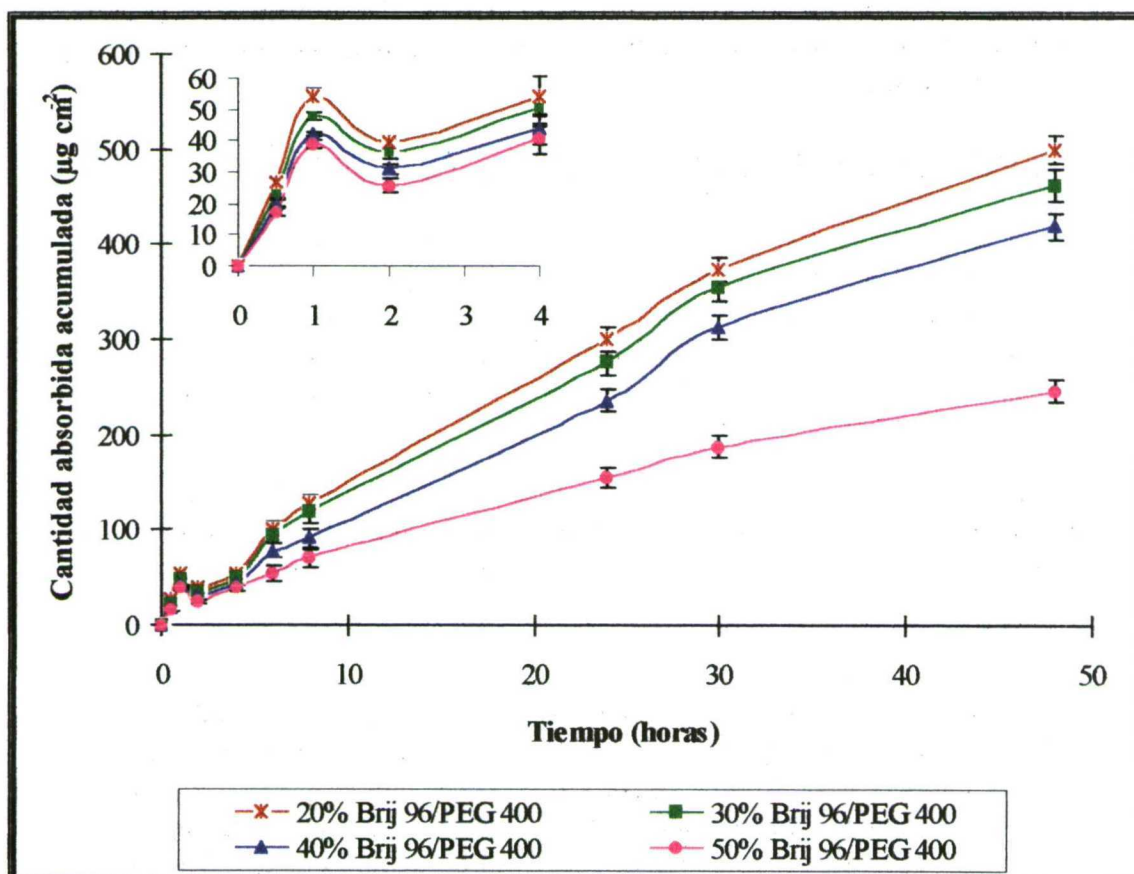


Figura 98. Perfiles de cesión in vitro de nifedipino desde microemulsiones múltiples o/a/o (microemulsión primaria (o/a)/Brij® 96/PEG 400/IPM con una relación fija tensioactivo/cotensioactivo 3:1) en función del contenido total Brij® 96/PEG 400.

En todas las microemulsiones se mantiene constante la concentración de nifedipino en la fase interna ($18 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) y externa ($0,8 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). La cantidad de nifedipino presente en la fase interna de todos los sistemas dispersos no varía, ya que presenta el mismo porcentaje fase interna incorporado (10%). Por el contrario, la cantidad de nifedipino presente en la fase externa aumenta a medida que lo hace el porcentaje de fase externa presente en las microemulsiones múltiples.

El objetivo de este estudio es evaluar el efecto que ejerce el contenido total Brij® 96/PEG 400 a una relación fija 3:1 sobre la cesión de nifedipino desde las distintas microemulsiones múltiples objeto de estudio. Como se puede apreciar en la figura 98 al aumentar el contenido total Brij® 96/PEG 400 disminuye la cantidad de nifedipino que se absorbe a través de la membrana artificial lipófila. Este efecto se observa desde las primeras horas de ensayo, aunque de forma más significativa a medida que transcurre el mismo. Sin embargo, a las 48 horas de ensayo las mayores diferencias observadas en las cantidades de nifedipino cedidas se producen desde la microemulsión múltiple o/a/o con un 50% Brij® 96/PEG 400 respecto al resto de formulaciones. Los perfiles de cesión del principio activo que se obtienen desde las microemulsiones múltiples o/a/o se pueden ajustar a cinéticas de orden cero.

En la tabla 46 se muestran los coeficientes de permeabilidad (K_p) de nifedipino desde las microemulsiones múltiples con variación en el contenido total Brij® 96/PEG 400 con una relación fija 3:1. Los K_p se calculan a partir del flujo obtenido en el estado estacionario, teniendo en cuenta la concentración total de nifedipino presente en cada uno de los sistemas dispersos.

<i>Microemulsión múltiple o/a/o</i>	<i>$K_p \cdot 10^3 \text{ (cm}\cdot\text{h}^{-1}\text{)}$</i>
20% Brij® 96/PEG 400	$5,85 \pm 0,061$
30% Brij® 96/PEG 400	$5,67 \pm 0,042$
40% Brij® 96/PEG 400	$4,88 \pm 0,034$
50% Brij® 96/PEG 400	$3,40 \pm 0,018$

Tabla 46. Coeficientes de permeabilidad (K_p) de nifedipino desde microemulsiones múltiples o/a/o (microemulsión primaria (o/a)/Brij® 96/PEG 400/IPM) en función del contenido total tensioactivo/cotensioactivo.

A medida que aumenta el contenido total Brij® 96/PEG 400 disminuye el K_p de nifedipino desde las microemulsiones múltiples. El K_p mayor corresponde a los sistemas dispersos con un 20% tensioactivo/cotensioactivo, siendo este valor de $5,85 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$.

Los K_p del principio activo, que se obtienen desde cada una de las microemulsiones múltiples o/a/o, son bastantes lineales respecto a los coeficientes de reparto IPM/agua calculados según los porcentajes presentes en cada microemulsión múltiple de fase interna, tensioactivo/cotensioactivo y fase externa (Figura 99). Debido a la relación lineal existente entre ambos parámetros, los coeficientes de reparto del nifedipino entre las fase oleosa y acuosa en presencia de distintas cantidades de PEG 400 pueden ser utilizados como una aproximación para evaluar la partición del fármaco dentro de la microemulsión múltiple. De esta manera, se puede dar una posible explicación a las diferencias existentes entre las cantidades cedidas de nifedipino desde

cada sistema disperso. A la vista de los resultados obtenidos se puede concluir que el PEG 400 constituye el factor limitante en la partición del fármaco entre las fases oleosas y la fase acuosa que constituyen la microemulsión múltiple. Los resultados de solubilidad del nifedipino en PEG 400 y en sistemas Brij 96/PEG 400, expuestos en el apartado 4.3.6. de la presente memoria, refrendan el papel que ejerce este solvente en la microemulsión múltiple.

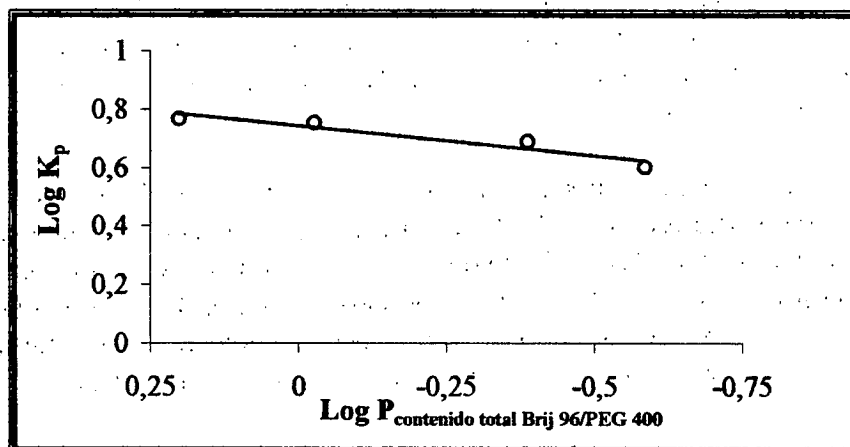


Figura 99. Logaritmos de los coeficientes de permeabilidad de nifedipino a través de la membrana artificial lipófila desde microemulsiones múltiples o/a/o con variación en el contenido total tensioactivo/cotensioactivo frente a los logaritmos de sus respectivos coeficientes de reparto.

El aumento de PEG 400 en los sistemas dispersos favorece la partición del fármaco desde la fase oleosa hacia la fase acuosa de la fase interna (microemulsión primaria), reduciendo a su vez la presencia del principio activo en la fase externa oleosa. Por consiguiente, se produce una disminución en el K_p y, así mismo, de la cantidad absorbida de fármaco a través de la membrana.

En la tabla 47 se muestran los porcentajes de nifedipino cedidos a distintos tiempos desde las microemulsiones múltiples en función del contenido total Brij® 96/PEG 400.

Microemulsión múltiple o/a/o	Cantidad cedida (% Dosis)		
	1 h	24 h	48 h
20% Brij® 96/PEG 400	4,80±0,13	26,59±1,27	44,24±1,89
30% Brij® 96/PEG 400	4,39±0,19	25,41±1,21	42,21±1,72
40% Brij® 96/PEG 400	3,99±0,12	22,20±1,16	39,65±1,32
50% Brij® 96/PEG 400	3,83±0,10	15,19±0,74	24,17±1,11

Tabla 47. Porcentaje de nifedipino cedido desde microemulsiones múltiples o/a/o a distintos tiempos en función del contenido total tensioactivo/cotensioactivo con una relación fija 3:1.

En la primera hora de ensayo, el porcentaje cedido de nifedipino desde las distintas formulaciones está comprendido entre el 3,8 y 4,8%. Al realizar una análisis estadístico (ANOVA) se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las microemulsiones múltiples con 40 y 50% tensioactivo/cotensioactivo. Aquellas formulaciones con menor contenido total tensioactivo/cotensioactivo y por lo tanto,

mayor porcentaje de fase externa (IPM) ceden mayor porcentaje de la dosis durante la primera hora de ensayo.

A las 24 horas de ensayo el porcentaje cedido de nifedipino desde las microemulsiones múltiples con variación en el contenido total tensioactivo/cotensioactivo está comprendido entre el 15,2 y 26,6%. El porcentaje cedido desde los sistemas dispersos con un contenido Brij® 96/PEG 400 comprendido entre el 20 y el 40% es similar. Al realizar un análisis estadístico de varianza (ANOVA) se observan diferencias estadísticamente significativas entre las microemulsiones múltiples con 20% y 40% Brij® 96/PEG 400.

Al finalizar el ensayo, los porcentajes cedidos de nifedipino desde los sistemas dispersos están comprendidos entre el 24,2 y el 44,2%. Las diferencias existentes en los porcentajes cedidos desde las microemulsiones múltiples con un contenido tensioactivo/cotensioactivo entre 20 y el 40% son muy pequeñas. El análisis estadístico de varianza (ANOVA) muestra que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las microemulsiones múltiples con un contenido total Brij® 96/PEG 400 comprendido entre el 20 y 40%.

El tiempo de latencia (t_l) de las microemulsiones múltiples (Tabla 48) disminuye en aquellos sistemas con un menor contenido en tensioactivo/cotensioactivo, ya que presentan mayor porcentaje de fase externa y por lo tanto, mayor cantidad de nifedipino incorporado en la misma. La disminución de este parámetro se debe a un incremento en el gradiente de concentración desde la fase externa oleosa hacia el compartimento receptor, por la presencia de una mayor cantidad de principio activo en la fase continua.

<i>Microemulsión múltiple o/a/o</i>	<i>t_l</i>
20% Brij® 96/PEG 400	0,014±0,007
30% Brij® 96/PEG 400	0,051±0,004
40% Brij® 96/PEG 400	0,063±0,005
50% Brij® 96/PEG 400	0,103±0,004

Tabla 48. *Tiempos de latencia de microemulsiones múltiples o/a/o cargadas de nifedipino en función del contenido total tensioactivo/cotensioactivo con una relación fija 3:1.*

En la figura 100 se observan los perfiles de flujo del nifedipino durante 48 horas desde microemulsiones múltiples, con variaciones en el contenido total Brij® 96/PEG 400 con una relación fija 3:1. Es importante destacar que el flujo de nifedipino desde las microemulsiones múltiples, en función del contenido total tensioactivo/cotensioactivo, se caracteriza por un aumento significativo durante la primera hora de ensayo, alcanzándose valores comprendidos entre el 53,5 y 34,6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. Este fenómeno se debe a la rápida cesión del principio activo localizado en la fase externa de la microemulsión múltiple. Aquellos sistemas dispersos con menor contenido Brij® 96/PEG 400 y, por lo tanto, mayor contenido en fase externa presentan mayor flujo al inicio del ensayo.

Entre la una y las cuatro horas de ensayo, en todas las microemulsiones múltiples, se produce una disminución significativa del flujo con valores comprendidos

entre 10,1 y 13,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, debido a una disminución en el gradiente de concentración desde la fase externa por cesión del nifedipino.

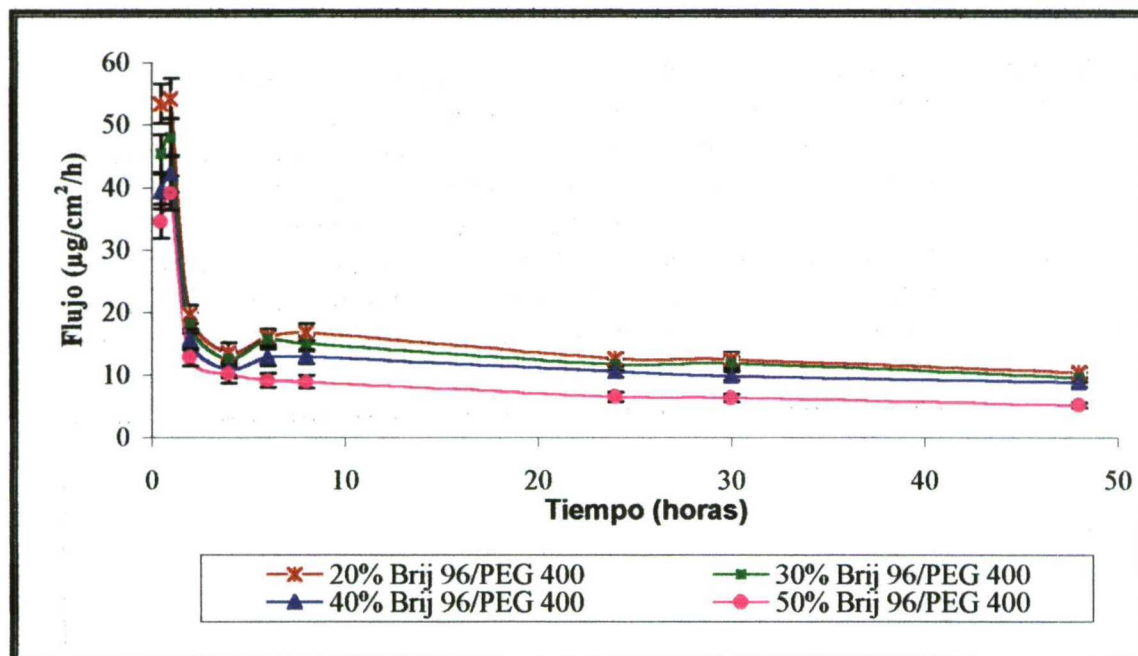


Figura 100. Flujos de nifedipino a través de la membrana PVDF desde microemulsiones múltiples o/a/o (microemulsión primaria (o/a)/Brij® 96/PEG 400/IPM)) cargadas de nifedipino en fase interna (18 mg/mL) y fase externa (0,8 mg/mL) en función del contenido total Brij® 96/PEG 400.

Para los sistemas dispersos con un contenido total tensioactivo/cotensioactivo comprendido entre el 20 y 40% se observa un aumento progresivo del flujo entre las 4 y 8 horas con valores medios de 15,4, 14,5, 12,2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. Por el contrario, en las microemulsiones múltiples con un 50% tensioactivo/cotensioactivo, el flujo disminuye en este intervalo de tiempo presentando un valor medio de 9,3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. Este distinto comportamiento se debe a que al aumentar el contenido total Brij® 96/PEG 400 hasta un 50%, se incrementa suficientemente la cantidad de PEG 400 como para dificultar la difusión de nifedipino desde la fase acuosa a la oleosa debido a su alta solubilidad en este cosolvente.

Desde las 8 horas hasta la finalización del ensayo se produce, en todos los sistemas dispersos, una disminución progresiva del flujo hasta valores comprendidos entre 5,1 y 10,4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, posiblemente, por un descenso en el gradiente de concentración que se genera desde la fase dispersa hacia la fase continua de los mismos. El descenso en el gradiente de concentración está propiciado por una disminución del contenido total de nifedipino en todos los sistemas dispersos.

Por último, hay que mencionar que en todas las etapas anteriormente mencionadas, las formulaciones con menor contenido tensioactivo/cotensioactivo presentan valores de flujo superiores.

Los flujos en el estado estacionario para las microemulsiones múltiples con 20, 30, 40 y 50% Brij® 96/PEG 400 son 13,6, 12,8, 10,6 y 7,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, respectivamente.

d) Influencia del contenido total de fase interna (microemulsión primaria o/a) sobre la cesión de nifedipino desde microemulsiones múltiples o/a/o en estudios de absorción in vitro.

La figura 101 muestra la cantidad cedida acumulada de nifedipino desde microemulsiones múltiples o/a/o con variación en el contenido de fase interna incorporada (microemulsión primaria o/a) dentro del intervalo comprendido entre 5 y 20% en peso, y con un contenido total en Brij® 96/PEG 400 del 30% en peso a una relación fija 3:1 (p/p). En todas las formulaciones se mantiene constante la concentración de nifedipino en la fase interna ($18 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) y externa ($0,8 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Sin embargo, las cantidades incorporadas en la fase interna y externa en cada una de las microemulsiones múltiples varían ya que también lo hace el porcentaje de fase interna y externa presente en las mismas.

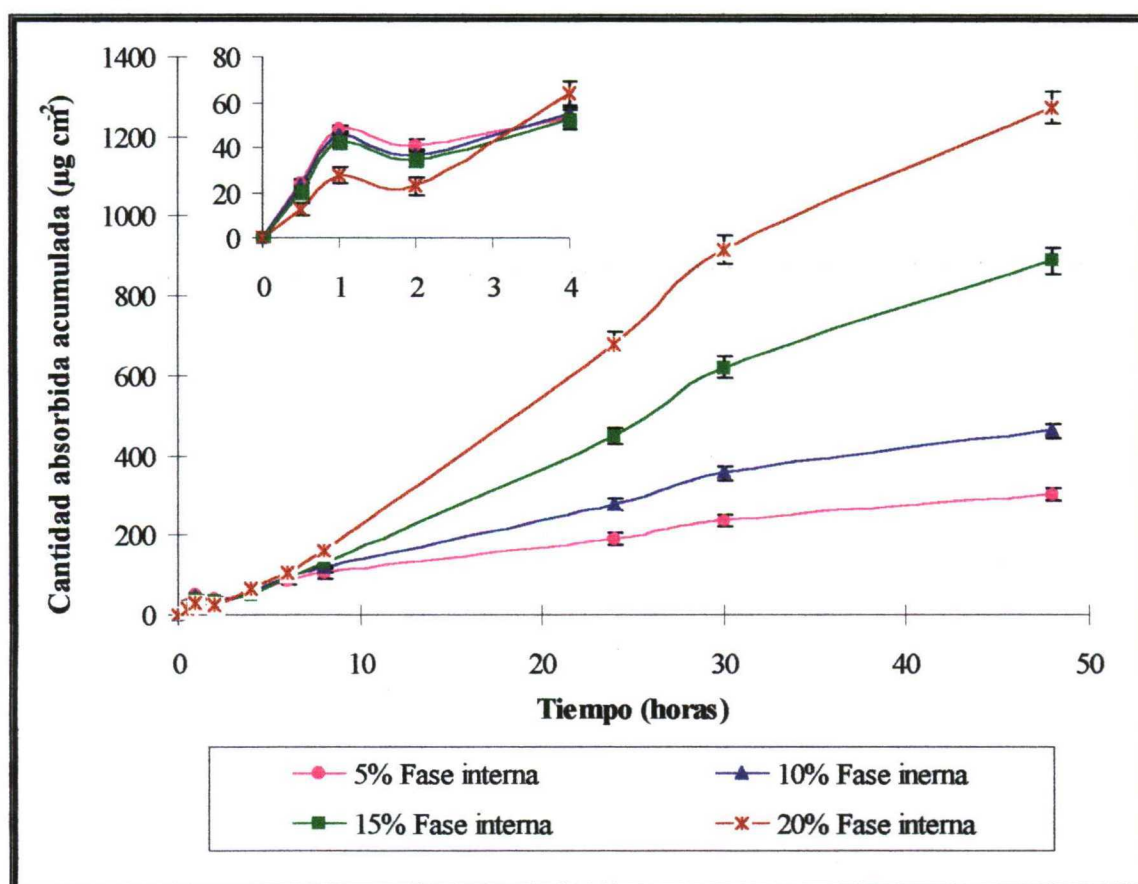


Figura 101. Perfiles de cesión in vitro de nifedipino desde microemulsiones múltiples o/a/o (microemulsión primaria(o/a)/Brij® 96/PEG 400/IPM) cargadas de nifedipino en fase interna y externa con variaciones en el contenido de fase interna y un contenido constante Brij® 96/PEG 400 del 30% en peso a una relación fija 3:1 (p/p).

La variación en el contenido de fase interna de las microemulsiones múltiples ejerce un efecto sobre la cesión de nifedipino a través de la membrana artificial de PVDF. Durante las primeras cuatro horas de ensayo, la cesión del principio activo está aumentada en las formulaciones con menor contenido en fase interna. Este comportamiento se debe a que los sistemas dispersos presentan un mayor contenido de fase externa oleosa y, por lo tanto, de nifedipino incorporado, favoreciéndose el

gradiente de concentración desde la fase interna al compartimento receptor a través de la membrana artificial.

Desde las 4 horas de ensayo hasta la finalización del mismo, las microemulsiones múltiples con mayor contenido en fase interna ceden mayor cantidad de nifedipino a través de la membrana artificial lipófila. Las diferencias en la cesión de nifedipino desde las distintas formulaciones se hacen más significativas a medida que transcurre el ensayo. Este efecto se aprecia con mayor claridad en los sistemas dispersos con un 15 y 20% de fase interna. Los perfiles de cesión de nifedipino que se obtienen desde las microemulsiones múltiples o/a/o se ajustan a cinéticas de orden cero.

Las diferencias observadas en la cesión de nifedipino desde las microemulsiones múltiples o/a/o se podrían deber al gradiente de concentración generado entre la fase interna y la fase externa oleosa de las mismas. Este parámetro desempeña una función vital en la cesión de nifedipino si se tienen en cuenta las grandes diferencias existentes en la cantidad de principio activo localizado en la fase interna, a medida que incrementa su porcentaje en los sistemas dispersos.

En la tabla 49 se muestran los coeficientes de permeabilidad (K_p) de nifedipino desde las microemulsiones múltiples con variación en el contenido de fase interna (microemulsión primaria o/a). Los K_p se calculan a partir del flujo obtenido en el estado estacionario, teniendo en cuenta la concentración total de nifedipino presente en cada uno de los sistemas dispersos.

<i>Microemulsión múltiple o/a/o</i>	<i>$K_p \cdot 10^3 (cm \cdot h^{-1})$</i>
<i>5% Fase interna</i>	<i>7,06±0,065</i>
<i>10% Fase interna</i>	<i>6,29±0,046</i>
<i>15% Fase interna</i>	<i>5,94±0,047</i>
<i>20% Fase interna</i>	<i>5,83±0,039</i>

Tabla 49. Coeficientes de permeabilidad (K_p) de las microemulsiones múltiples o/a/o (microemulsión primaria o/a/Brij® 96/PEG 400/IPM) cargadas de nifedipino en función del contenido de fase interna (microemulsión primaria o/a).

Los mayores coeficientes de permeabilidad corresponden a aquellos sistemas dispersos con menor contenido en fase interna. Los coeficientes de permeabilidad de nifedipino a través de la membrana artificial lipófila son bastantes lineales en relación a los coeficientes de reparto IPM/agua obtenidos en presencia de PEG 400 y propilenglicol según la composición cuantitativa y cualitativa de las formulaciones. Debido a la relación lineal existente entre ambos parámetros, los coeficientes de reparto del nifedipino entre la fase oleosa y acuosa en presencia de distintas cantidades de propilenglicol y cantidades constantes de PEG 400, se pueden utilizar como una aproximación para evaluar la partición del fármaco dentro de la microemulsión múltiple

Como se observa en la figura 102, a medida que aumenta el contenido en fase interna disminuye el coeficiente de permeabilidad de nifedipino desde las distintas microemulsiones múltiples. Este comportamiento se puede deber a dos causas: 1) dilución de la concentración de PEG 400 presente en las formulaciones al aumentar el

porcentaje de fase interna, cuyo componente mayoritario es agua. Por este motivo, disminuye la partición del fármaco desde la fase interna oleosa a la fase acuosa, 2) disminución de la partición de nifedipino desde la fase acuosa a la fase externa oleosa en las múltiples microemulsiones o/a/o con mayor contenido de fase interna, por la presencia de menor porcentaje de fase continua.

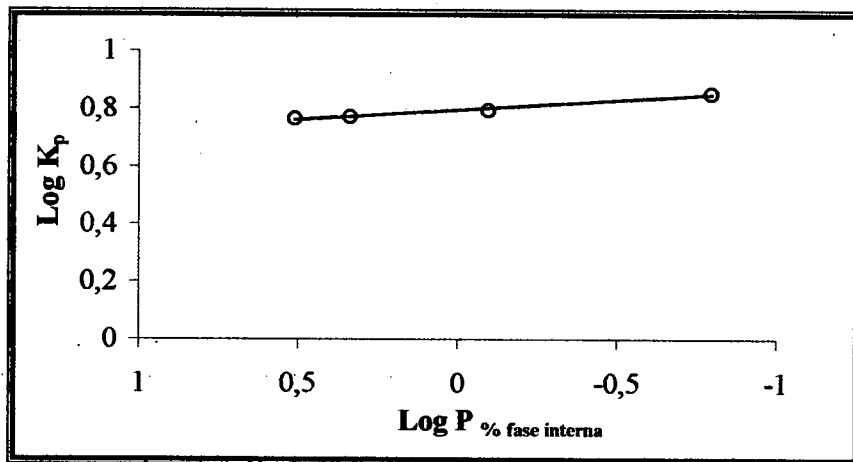


Figura 102. Logaritmos de los coeficientes de permeabilidad de nifedipino a través de la membrana artificial lipófila desde microemulsiones múltiples con variaciones en el contenido de fase interna (microemulsión primaria o/a) frente a los logaritmos de sus respectivos coeficientes de reparto.

En los sistemas dispersos con mayores coeficientes de permeabilidad no se obtienen las mayores cantidades cedidas de nifedipino. Sin embargo, en aquellas microemulsiones múltiples con K_p bajos la mayor cesión del principio activo se debe a un aumento del gradiente de concentración entre la fase interna y la fase externa, al aumentar considerablemente la concentración de nifedipino mediante la incorporación de un mayor contenido de fase dispersa.

Los porcentajes cedidos de nifedipino desde las microemulsiones múltiples con variación en el contenido de fase interna (microemulsión primaria o/a) se muestran en la tabla 50.

Microemulsión múltiple o/a/o	Cantidad cedida (% Dosis)		
	1 h	24 h	48 h
5% Fase interna	7,13±0,24	26,43±1,14	42,68±2,27
10% Fase interna	4,12±0,08	28,42±1,22	46,21±2,45
15% Fase interna	2,83±0,09	29,68±1,43	55,87±2,78
20% Fase interna	2,54±0,10	35,32±1,68	62,07±3,12

Tabla 50. Porcentaje cedido de nifedipino desde microemulsiones múltiples o/a/o a distintos tiempos, en función del contenido en fase interna (microemulsión primaria o/a).

Durante la primera hora de ensayo, se aprecian diferencias en el porcentaje de nifedipino cedido desde los sistemas dispersos. Las microemulsiones múltiples o/a/o con mayor porcentaje de fase externa y, por lo tanto, mayor cantidad de nifedipino son las que ceden mayor porcentaje de principio activo al comienzo del ensayo. Al realizar

un ANOVA no se observan diferencias estadísticamente significativas entre las microemulsiones múltiples con 15 y 20% de fase interna.

A las 24 horas de ensayo el porcentaje cedido de nifedipino desde las microemulsiones múltiples con variación en el contenido de fase interna está comprendido entre 26,4 y 35,3%. El porcentaje cedido desde los sistemas dispersos con un contenido en fase interna comprendido entre el 5 y el 15% es similar. Al realizar un análisis estadístico de varianza (ANOVA) no se observan diferencias estadísticamente significativas entre las microemulsiones múltiples con un contenido total de fase interna comprendido entre el 5 y 15%.

A las 48 horas de ensayo, el porcentaje cedido de nifedipino desde las microemulsiones múltiples con variación en el contenido en fase interna está comprendido entre el 42,7 y 62,1%. Como se puede apreciar, los sistemas dispersos con mayor contenido en fase dispersa son los que ceden los mayores porcentajes de nifedipino. Al realizar un ANOVA se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las microemulsiones múltiples con 5 y 10% de fase interna.

La disminución del tiempo de latencia (t_l) depende de la cantidad de nifedipino incorporada en la fase externa (Tabla 51). A medida que disminuye el porcentaje de fase interna incorporado en las microemulsiones múltiples aumenta el porcentaje de fase externa y, por lo tanto, la cantidad de nifedipino incorporado en la misma dando lugar a una disminución del tiempo de latencia.

Microemulsión múltiple o/a/o	t_l
5% Fase interna	0,014±0,007
10% Fase interna	0,051±0,004
15% Fase interna	0,063±0,005
20% Fase interna	0,103±0,004

Tabla 51. Tiempos de latencia de microemulsiones múltiples o/a/o de nifedipino en función del contenido de fase interna (microemulsión primaria o/a).

En la figura 103 se observan los perfiles de flujo del nifedipino durante 48 horas, desde microemulsiones múltiples con variación en el contenido de fase interna. Como se puede observar en esta figura, durante la primera hora de ensayo se produce un aumento del flujo desde cada una de las microemulsiones múltiples. Este efecto es más significativo en los sistemas con menor contenido en fase interna, ya que en ellos se encuentra favorecido el gradiente de concentración desde la fase externa al compartimento receptor al presentar mayor cantidad de principio activo incorporado en la fase continua. Los valores de flujo de las microemulsiones múltiples o/a/o a la hora de ensayo se encuentran comprendidos entre 29,9 y 48,0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$.

Desde la primera hasta la cuarta hora de ensayo se observa una disminución del flujo en todas las microemulsiones múltiples con valores comprendidos entre 13,2 y 13,8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, excepto para la microemulsiones con un 20% de fase interna donde la disminución del flujo se produce a las 2 horas de ensayo (11,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$). Las microemulsiones múltiples con menor contenido en fase interna siguen presentando los mayores valores de flujo.

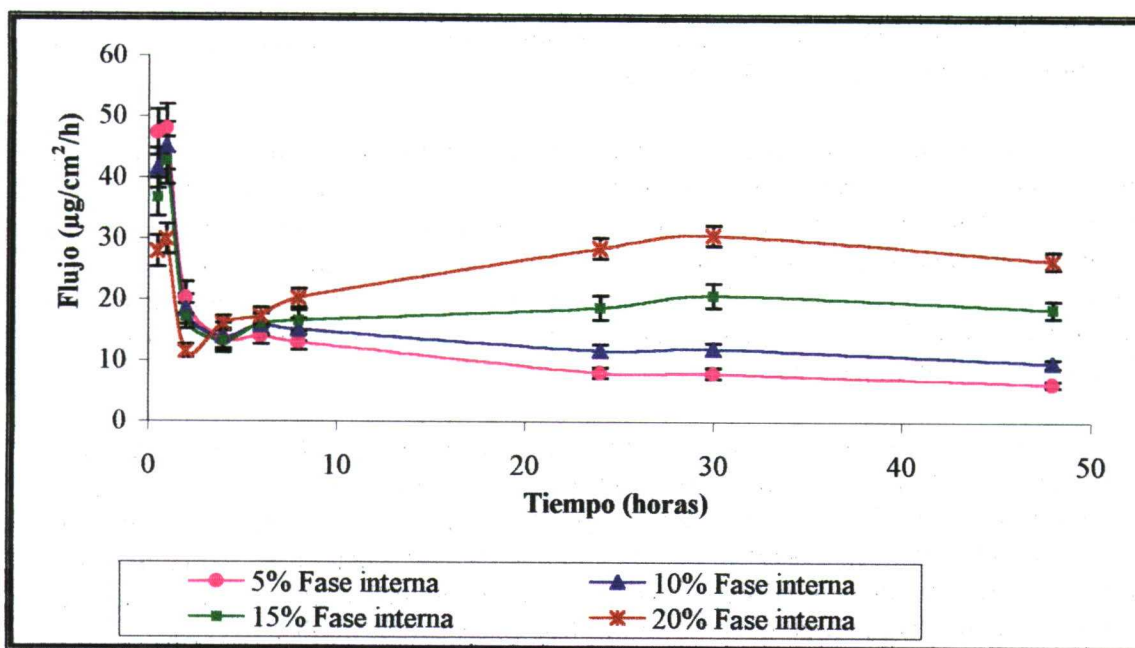


Figura 103. Flujos de nifedipino a través de la membrana PVDF desde microemulsiones múltiples o/a/o de nifedipino (microemulsión primaria (o/a)/Brij® 96/PEG 400/IPM) en función del contenido de fase interna (microemulsión o/a).

Es interesante destacar el comportamiento de los perfiles de flujo observado para cada microemulsión múltiple a partir de las 4 horas de ensayo. Las microemulsiones múltiples o/a/o con un contenido en fase interna del 5 y 10% experimentan una disminución lenta y progresiva del flujo hasta la finalización del ensayo, con valores de 6,3 y 9,6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, respectivamente. Este comportamiento se puede explicar por una disminución del gradiente de concentración del principio activo generado desde la fase interna hacia externa en estos sistemas dispersos a medida que transcurre el ensayo.

Sin embargo, las microemulsiones múltiples o/a/o con un contenido en fase interna del 15% son capaces de mantener el flujo constante desde las 4 hasta las 30 horas de ensayo (20,7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$), disminuyendo ligeramente a las 48 horas hasta valores de flujo de 18,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$.

En la microemulsión múltiple con un 20% de fase interna, también, se observa una incremento progresivo del flujo desde las 2 hasta las 30 horas de ensayo, siendo este valor de 30,6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. Posteriormente, disminuye ligeramente el flujo hasta 26,6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ a las 48 horas de ensayo.

A diferencia de lo comentado con las formulaciones con menor contenido en fase interna, este comportamiento se debe al incremento con el tiempo del gradiente de concentración generado desde la fase interna hacia la fase externa oleosa, debido a la cantidad elevada de principio activo presente en la fase dispersa.

Los flujos en el estado estacionario para las microemulsiones múltiples o/a/o con un 5, 10, 15 y 20% de fase interna son de 9,8, 14,2, 18,5 y 23,2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, respectivamente.

6.1.4.-Estudios comparativos de cesión in vitro de nifedipino desde sistemas dispersos o/a/o, o/a y a/o constituidos por Brij® 96/PEG 400 como tensioactivo/cotensioactivo

El objetivo de este estudio es evaluar la absorción de nifedipino a través de la membrana de PVDF, empleada como modelo de piel desde sistemas dispersos o/a/o, o/a y a/o, y las ventajas que ofrecen las microemulsiones múltiples o/a/o respecto a las microemulsiones a/o y o/a.

- Método:

Para poder hacer un estudio comparativo de los perfiles de cesión de nifedipino obtenidos desde los sistemas dispersos o/a/o, a/o y o/a, el desarrollo de todas las formulaciones se realiza con la misma composición cuantitativa de fase interna (microemulsión primaria o/a, IPM y agua) tensioactivo/cotensioactivo (Brij® 96/PEG 400) y fase externa (IPM y agua).

Debido a que no es posible el desarrollo galénico de microemulsiones o/a y a/o con la misma composición cuantitativa que la microemulsión múltiple o/a/o seleccionada (fase interna/Brij® 96/PEG 400/IPM; 20/30/50; p/p/p), en este estudio comparativo se emplean sistemas dispersos constituidos por un 10% fase interna, 30% tensioactivo/cotensioactivo y 60% fase externa.

Así, las microemulsiones o/a están constituidas por un 10% IPM como fase interna, 30% Brij® 96/PEG 400 (tensioactivo/cotensioactivo) y 60% agua (fase externa). El desarrollo de este tipo de microemulsiones se ha descrito ampliamente en el apartado 5.1.6. La composición cuantitativa de las microemulsiones a/o corresponde a un 10% agua, 30% Brij® 96/PEG 400 y 60% de IPM. El desarrollo de este tipo de microemulsiones se realiza utilizando el mismo método que el empleado para las microemulsiones o/a.

La concentración total de principio activo presente en la microemulsión múltiple o/a/o y en la microemulsión o/a es de $2,55 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, mientras que en la microemulsión a/o es de $1,6 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (máxima cantidad de principio activo capaz de solubilizarse en la fase oleosa).

En el desarrollo de estos sistemas dispersos, el nifedipino, debido a su carácter lipófilo, se incorpora en la fase interna (IPM) de la microemulsión o/a y en la fase externa (IPM) de la microemulsión a/o. En la microemulsión múltiple o/a/o la cantidad de principio activo incorporado en la fase interna oleosa es de $18 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ y en la fase externa oleosa de $0,8 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Las condiciones experimentales y el tratamiento de los datos se han descrito ampliamente en el apartado 6.1.3. del presente capítulo.

- Resultados y comentarios:

En la figura 104 se comparan los perfiles de cesión del nifedipino a través de la membrana de PVDF desde la microemulsión múltiple o/a/o, y las microemulsiones o/a

y a/o. Como se observa, la incorporación de nifedipino en los sistemas dispersos estudiados da lugar a diferencias en los perfiles de cesión del fármaco a través de la membrana artificial lipófila.

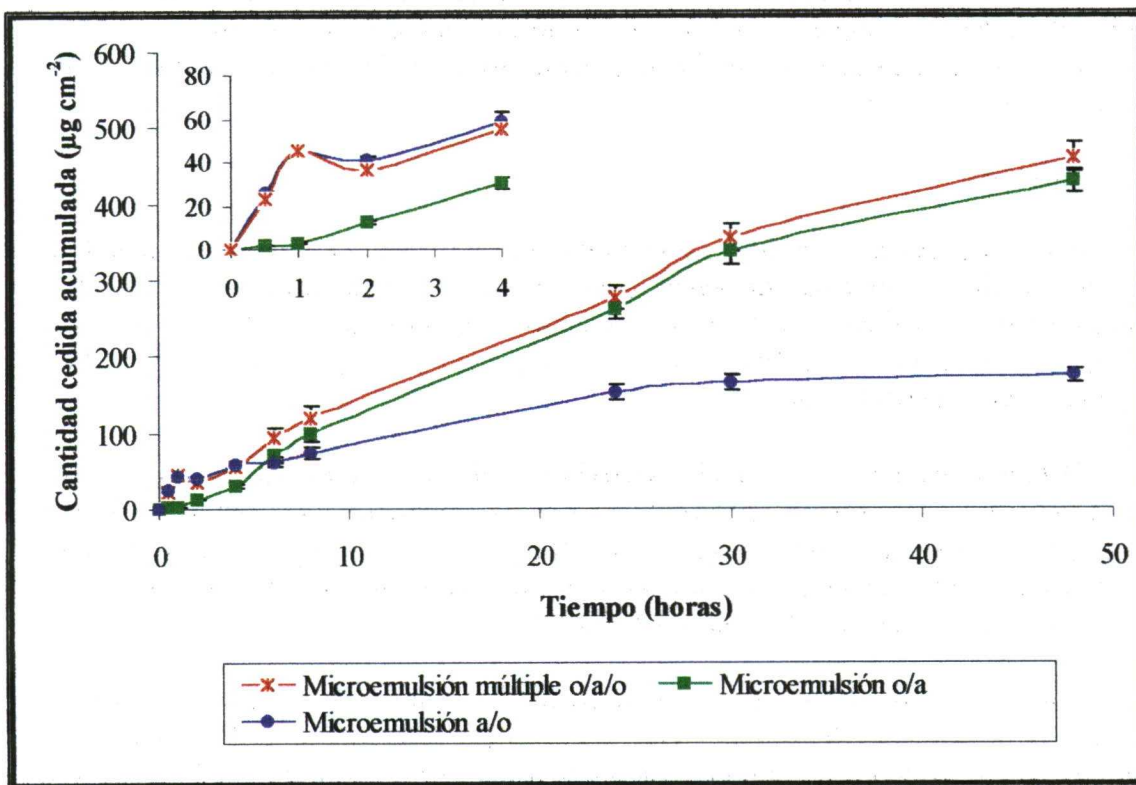


Figura 104. Perfiles de cesión de nifedipino desde sistemas dispersos (10% fase interna/30% Brij® 96/PEG 400/60% fase externa) o/a/o, o/a y a/o a través de la membrana de PVDF.

Durante las primeras cuatro horas de ensayo la mayor cesión de nifedipino en cuanto a magnitud y extensión se produce desde la microemulsión a/o. Este fenómeno es debido a la mayor concentración de nifedipino localizado en la fase externa ($1,6 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) respecto a las microemulsiones múltiples ($0,8 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) y la microemulsión o/a. En la microemulsión o/a, la cesión de nifedipino desde la fase externa es muy rápida durante este tiempo y no está regulada por la presencia de principio activo en la fase interna. Posteriormente, se produce un aumento progresivo de la absorción a través de la membrana artificial hasta alcanzar una etapa de meseta desde las 30 horas de ensayo hasta la finalización del mismo.

En la microemulsión o/a/o la incorporación de nifedipino en su fase externa favorece inicialmente la cesión del principio activo durante la primera hora de ensayo. A las 2 horas de ensayo se produce un descenso en la cantidad cedida de nifedipino ya que la concentración de principio en la fase externa disminuye, y el nifedipino incorporado en la fase interna tiene que difundir a la fase externa. A partir de las 4 horas hasta la finalización del ensayo se produce un aumento progresivo de la cesión de nifedipino. A partir de las 6 horas de ensayo la mayor cesión de nifedipino, de los sistemas dispersos estudiados, se produce desde la microemulsión múltiple o/a/o. La fase externa oleosa (IPM) presente en el sistema disperso o/a/o permite, inicialmente, la cesión de nifedipino incorporado en la misma y posteriormente, su partición desde la

fase interna a la fase continua. El resultado final de ambos efectos es una mayor cesión del principio activo durante el ensayo.

En la microemulsión o/a, se produce una menor cesión de nifedipino durante las primeras 6 horas de ensayo en comparación con los sistemas dispersos o/a/o y a/o, ya que el principio activo tiene que difundir desde la fase dispersa a la fase continua para se absorba posteriormente a través de la membrana. Únicamente, el nifedipino presente en la fase continua es capaz de atravesar la membrana de PVDF. En este tipo de microemulsiones, la absorción está inicialmente gobernada por la pequeña concentración de nifedipino presente en la fase externa (agua). A continuación, una vez que el nifedipino alcanza la fase externa, la absorción a través de la membrana aumenta debido al gradiente de concentración que se produce desde la fase oleosa hacia la acuosa.

Por lo comentado anteriormente, se puede concluir que la microemulsión múltiple o/a/o y la microemulsión o/a ejercen un efecto reservorio debido a la incorporación del principio activo en la fase interna, originándose, en ambos casos, un gradiente de concentración positivo desde la fase interna a la fase externa. Debido a este efecto reservorio los perfiles de absorción de los sistemas dispersos o/a/o y o/a se ajustan a cinéticas de orden cero, en comparación a la cinética de orden uno observada en la microemulsión a/o.

La tabla 52 muestra los coeficientes de permeabilidad (K_p) y los tiempos de latencia de nifedipino desde la microemulsión múltiple o/a/o y las microemulsiones o/a y a/o.

Microemulsión	$K_p \cdot 10^3$ ($\text{cm} \cdot \text{h}^{-1}$)	t_l (horas)
o/a/o	6,29±0,046	0,051±0,004
o/a	4,91±0,033	0,474±0,012
a/o	19,1±0,121	0,018±0,003

Tabla 52. Coeficientes de permeabilidad (K_p) y tiempos de latencia (t_l) de nifedipino desde los sistemas dispersos o/a/o, o/a y a/o (10% fase interna, 30% /Brij® 96/PEG 400 y 60% fase externa) a través de la membrana de PVDF.

La permeabilidad máxima de nifedipino se observa con la microemulsión a/o en la que no existe efecto reservorio que regule la cantidad de principio activo, localizado en la fase externa, que se absorbe a través de la membrana artificial. Sin embargo, en los sistemas dispersos con efecto reservorio que presentan igual concentración de principio activo, la microemulsión múltiple o/a/o presenta mayor coeficiente de permeabilidad de nifedipino que la microemulsión o/a. Este fenómeno puede explicarse por la fuerza conductora que ejerce la fase externa oleosa (IPM), presente en el sistema disperso o/a/o, sobre la partición del principio activo localizado en la fase interna.

Los sistemas dispersos o/a/o y a/o, que permiten la incorporación de nifedipino en la fase externa oleosa, presentan menores valores en el tiempo de latencia. Por el contrario, la microemulsión o/a presenta un t_l mayor, ya que el nifedipino tiene que difundir durante la primera hora de ensayo desde la fase interna a la externa.

En la tabla 53 se muestran los porcentajes cedidos de nifedipino a distintos tiempos desde los sistemas dispersos o/a/o, o/a y a/o.

<i>Microemulsión</i>	<i>Cantidad cedida (% Dosis)</i>		
	<i>1 h</i>	<i>24 h</i>	<i>48 h</i>
<i>o/a/o</i>	4,12±0,08	28,42±1,22	42,21±2,45
<i>o/a</i>	0,27±0,02	23,86±0,89	38,33±1,84
<i>a/o</i>	9,48±0,11	32,51±1,37	37,41±1,72

Tabla 53. Porcentaje cedido de nifedipino desde sistemas dispersos (10% fase interna/30% Brij® 96/PEG 400/60% fase externa) o/a/o, o/a y a/o a distintos tiempos.

Como se puede apreciar, durante la primera hora de ensayo el porcentaje cedido de nifedipino desde los sistemas dispersos o/a/o y a/o con nifedipino incorporado en la fase externa es 15,3 y 35,1 veces superior respecto a la microemulsión o/a.

A las 24 horas de ensayo, el mayor porcentaje cedido de nifedipino corresponde a la microemulsión a/o. Sin embargo, los porcentajes cedidos de nifedipino desde los sistemas dispersos con igual concentración de principio activo (microemulsión o/a y microemulsión múltiple o/a/o) son similares. Al realizar un ANOVA, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los sistemas dispersos o/a/o y o/a.

A las 48 horas de ensayo, el mayor porcentaje de nifedipino cedido corresponde al sistema disperso o/a/o. Los porcentajes cedidos desde los sistemas dispersos o/a/o y o/a, con igual concentración de principio activo, son 38,3 y 42,2%, respectivamente. Al realizar un ANOVA no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los sistemas dispersos o/a/o y o/a.

Los perfiles de flujo de la microemulsión múltiple o/a/o y las microemulsiones o/a y a/o se muestran en la figura 105.

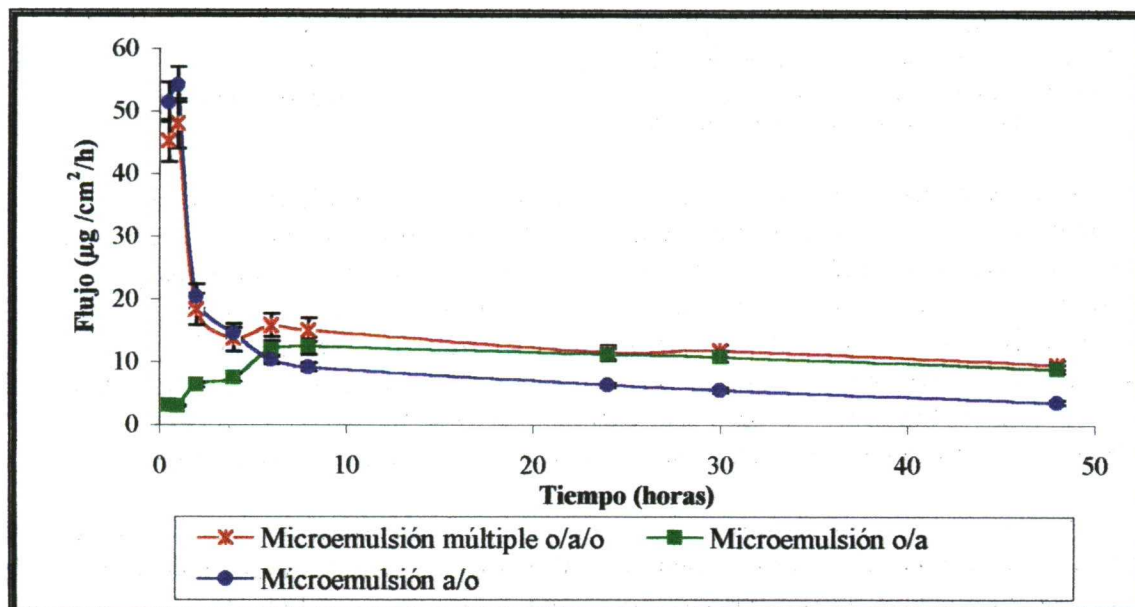


Figura 105. Flujos de nifedipino a través de la membrana PVDF desde los sistemas dispersos o/a/o, o/a y o/a constituidos por 10% fase interna, 30% Brij® 96/PEG 400 y 60% IPM.

La incorporación de nifedipino en la fase externa de la microemulsión múltiple o/a/o y microemulsión a/o incrementa significativamente los valores de flujo durante las primeras horas de ensayo, en comparación con la microemulsión o/a. Este aumento del flujo se debe a la total disponibilidad del nifedipino, presente en la fase externa oleosa de los sistemas dispersos o/a/o y a/o, para absorberse a través de la membrana.

Los perfiles de flujo de los sistemas dispersos o/a/o y a/o se caracterizan por un incremento considerable de los valores de flujo ($\approx 51 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) durante la primera hora de ensayo, seguido de una disminución drástica a las 2 horas de ensayo hasta valores de 18,3 y 20,4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, respectivamente. Posteriormente, se produce una disminución menos acusada del flujo, alcanzándose una etapa de meseta entre 6 y las 8 horas de ensayo con valores medios de 14,9 para la microemulsión múltiple o/a/o y de 9,8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ para la microemulsión a/o. Después, se produce una disminución progresiva de este parámetro hasta la finalización del ensayo con valores de 9,6 y 3,6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ para los sistemas dispersos o/a/o y a/o, respectivamente.

Los valores de flujo en el estado estacionario obtenidos desde los sistemas dispersos o/a/o y a/o son de 12,9 y 8,6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, respectivamente.

El perfil de flujo de la microemulsión o/a se caracteriza por valores muy pequeños en el flujo de nifedipino durante la primera hora de ensayo (aproximadamente 3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$). Una vez que el nifedipino difunde desde la fase interna a la externa y por lo tanto pueda absorberse a través de la membrana de PVDF, los valores de flujo incrementan progresivamente hasta 12,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ a las 8 horas de ensayo. Posteriormente y hasta la finalización del ensayo, se produce una disminución constante de este parámetro (8,9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$). El flujo en el estado estacionario es de 9,9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$.

Los mayores valores de flujo de nifedipino obtenidos en la microemulsión múltiple o/a/o respecto a la microemulsión o/a pueden atribuirse a: 1) la incorporación de nifedipino en la fase externa oleosa, favoreciéndose su cesión durante las dos primeras horas de ensayo y 2) la fuerza de conducción que ejerce la fase externa oleosa sobre el nifedipino localizado en la fase interna. De esta manera, facilita la partición del principio activo desde la fase interna a la fase externa.

6.2.- Estudios de cesión in vitro de nifedipino a través de membrana artificial de PVDF desde microemulsiones múltiples o/a/o constituidas por microemulsión primaria o/a, Brij® 96, propilenglicol y IPM.

Este estudio se realiza con el fin de determinar el perfil de cesión de la microemulsión múltiple o/a/o de nifedipino seleccionada (20% microemulsión primaria, 30% Brij® 96/ PG y IPM), el efecto que ejerce la incorporación del principio activo en la fase interna y externa sobre la cesión y la posible influencia de la composición del vehículo en la difusión del fármaco desde la propia formulación.

Las membranas artificiales se utilizan en numerosos trabajos en estudios de preformulación de numerosos fármacos, y sirven para seleccionar de manera preliminar entre las distintas formulaciones desarrolladas.

En este estudio, también, se determinan una serie de parámetros (coeficiente de permeabilidad, flujo, cantidad cedida, etc.) con el fin de explicar y evaluar la absorción del nifedipino a través de la membrana artificial seleccionada.

6.2.1.- Preparación de las microemulsiones

Se desarrollan distintos tipos de microemulsiones múltiples o/a/o (microemulsión primaria o/a/ Brij® 96, PG y IPM) con variaciones en la cantidad incorporada de principio activo y en la composición cuantitativa de los componentes que la constituyen:

- a) Microemulsiones múltiples o/a/o con distintas cantidades de principio activo incorporadas en la fase externa.
- b) Microemulsiones múltiples o/a/o con variaciones en la relación Brij® 96 /PG.
- c) Microemulsiones múltiples o/a/o con variaciones en el contenido total Brij® 96 /PG.
- d) Microemulsiones múltiples o/a/o con variaciones en el contenido total de fase interna.

Otro punto importante de este estudio es el desarrollo de microemulsiones o/a y a/o con la misma composición cuantitativa y cualitativa que una microemulsión múltiple o/a/o con el fin de comparar los perfiles de difusión y determinar las diferencias existentes entre estos sistemas dispersos.

- Método:

El desarrollo galénico de las microemulsiones múltiples o/a/o formuladas en esta sección, así como la incorporación del principio activo en la fase interna y externa se han descrito detalladamente en el *apartado 5.4* de la presente memoria. Hay que señalar que el superíndice “*” utilizado en la notación de las microemulsiones múltiples o/a/o indica la presencia de nifedipino en la fase interna, externa o ambas.

Todas las microemulsiones múltiples o/a/o presentan la misma composición cualitativa de fase interna (microemulsión primaria o/a). La cantidad incorporada a la microemulsión primaria o/a se mantiene siempre constante, a una concentración de 18 mg ml⁻¹. Así, las variaciones en el contenido de principio activo dentro de las microemulsiones múltiples, sin tener en cuenta la concentración de nifedipino presente en la fase externa, dependerá de la cantidad (en peso) de fase interna incorporada.

- a) Para determinar el efecto de la incorporación de nifedipino en la fase externa sobre su perfil de cesión desde la microemulsión múltiple o/a/o seleccionada (microemulsión primaria o/a/ Brij® 96/PG 400/IPM; 20/30/50 (p/p/p), a una relación fija tensioactivo/cotensioactivo 3:1 (p/p)) se incorporan las siguientes cantidades de nifedipino en la fase externa (IPM): 0, 4 y 8 mg que corresponden, respectivamente, a

las concentraciones de 0, 0,8 y 1,6 mg·ml⁻¹. La concentración de nifedipino presente en la fase interna se mantiene constante (18 mg·ml⁻¹). Como formulación control se desarrolla la misma microemulsión múltiple con la máxima concentración de nifedipino presente en la fase externa (1,6 mg·ml⁻¹).

b) En el desarrollo galénico de microemulsiones múltiples o/a/o en las que se modifica la relación tensioactivo/cotensioactivo no es posible mantener la proporción de los componentes que constituyen la microemulsión múltiple seleccionada. Para llevar a cabo este estudio se emplean microemulsiones múltiples constituidas por un 10% en peso de microemulsión primaria o/a, 35% en peso de Brij® 96/PG y 65% en peso de IPM con una relación tensioactivo/cotensioactivo comprendida entre 2:1 y 4:1. Las concentraciones de nifedipino incorporadas en la fase interna y externa se mantienen constantes, siendo de 18 mg·ml⁻¹ y de 0,8 mg·ml⁻¹ respectivamente. Como formulación control se emplea una microemulsión múltiple con la misma composición cuantitativa y cualitativa pero en ausencia de PG.

c) En el desarrollo galénico de microemulsiones múltiples con variación en el contenido total Brij® 96/PG a una proporción fija 3:1 (p/p) no es posible mantener la proporción de fase interna de la microemulsión múltiple o/a/o seleccionada. Para poder llevar a cabo este estudio se seleccionan microemulsiones múltiples constituidas por un 10% en peso de fase interna y una proporción variable Brij® 96/PG comprendida entre el 30 y 45% en peso. Las concentraciones de nifedipino incorporadas en la fase interna y externa se mantienen constantes siendo de 18 mg·ml⁻¹ y de 0,8 mg·ml⁻¹, respectivamente.

d) En el desarrollo galénico de microemulsiones múltiples con variación en el contenido de fase interna, se mantiene constante el porcentaje Brij® 96/PG, a una relación 3:1, que corresponde al de la microemulsión múltiple o/a/o seleccionada (30% en peso). El contenido en fase interna incorporado en los sistemas dispersos (microemulsión primaria o/a) está comprendido entre el 5 y 20% en peso. La cantidad de nifedipino incorporada en la fase externa se mantiene constante a 0,8 mg·ml⁻¹. La cantidad de principio activo presente en la fase interna depende del porcentaje de esta incorporado en la microemulsión múltiple o/a/o, teniendo en cuenta que la concentración de nifedipino se mantiene constante a 18 mg·ml⁻¹.

En el estudio comparativo de microemulsiones múltiples o/a/o y microemulsiones o/a y a/o se seleccionan sistemas dispersos con la siguiente composición cualitativa y cuantitativa: 10% fase interna (microemulsión primaria, IPM o agua), 35% Brij® 96/PG y 55% de fase externa (IPM o agua).

6.2.2.-Determinación de los coeficientes de partición

La determinación de los coeficientes de reparto es de vital importancia ya que permiten, por un lado, determinar si es posible formular el nifedipino en sistemas dispersos constituidos por una fase acuosa y otra oleosa y decidir en cual de ellas irá incorporado; por otro lado, permite dar una explicación a los fenómenos difusión del fármaco desde cada una de las formulaciones desarrolladas

- Método:

Se determinan los siguientes coeficientes de reparto del nifedipino:

a) Coefficientes de reparto de nifedipino en octanol/tampón fosfato (pH=7,4) (P_{oct}) y octanol/agua destilada ($P_{oct/agua}$): se han determinado en el apartado 6.1. de este capítulo.

b) Coefficientes de reparto de nifedipino en IPM/tampón fosfato pH=7,4 (P_{IPM}) y IPM/agua ($P_{oct/agua}$): se han determinado en el apartado 6.1. de este capítulo.

c) Coefficientes de reparto de nifedipino en IPM/agua en presencia de distintas cantidades de PG, según la relación Brij 96/PG presente en las microemulsiones múltiples o/a/o objeto de estudio: se adicionan distintos porcentajes de PG (11,66%, 8,75% y 7% v/v), correspondientes, respectivamente, a la relación Brij 96/PG 400 2:1, 3:1 y 4:1 de la microemulsión múltiple, a 16,37 ml de la fase externa de la microemulsión múltiple (IPM) y a 2,5 ml de la mezcla IPM, propilenglicol y agua según las proporciones de la microemulsión primaria o/a.

Con el fin de evaluar el efecto del PG en la partición del nifedipino en las microemulsiones múltiples o/a/o, se procede de la misma manera que se ha mencionado anteriormente pero sin la adición del cotensioactivo al sistema.

Una vez preparados todos los sistemas, se adiciona un exceso de principio activo. Estos sistemas se someten a agitación hasta alcanzar el equilibrio entre las dos fases. Después todas las muestras se centrifugan a 8000 g durante 5 minutos con el fin de separar ambas fases, se determina la concentración de nifedipino en las mismas, y se calcula el coeficiente de reparto.

Se mantienen en todos los casos la composición cuantitativa y cualitativa de las formulaciones desarrolladas en el apartado 6.2.1.

d) Coefficientes de reparto de nifedipino en IPM/agua en presencia de distintas cantidades de PG, según el contenido total Brij 96/PG, a una relación fija 3:1, presente en las microemulsiones múltiples o/a/o objeto de estudio: los ensayos se realizan a partir de microemulsiones múltiples constituidas por un 10% en peso de fase interna (microemulsión primaria o/a) y una proporción variable Brij® 96/PG, a una relación fija 3:1, comprendido entre el 30 y 45% en peso.

Se adicionan distintos porcentajes de PG (7,5%, 8,75%, 10% y 11,25% v/v), correspondientes a contenidos totales Brij® 96/PEG 400 del 30, 35, 40 y 45% en peso presentes en la microemulsión múltiple, a cantidades de fase externa del sistema disperso (IPM) comprendidas entre 17,5-13,2 ml y a 2,5 ml de la mezcla IPM, propilenglicol y agua, según las proporciones de la microemulsión primaria o/a.

Se mantiene en todos los casos la composición cuantitativa y cualitativa de las formulaciones desarrolladas en el apartado 6.2.1. La determinación de los coeficientes.

de reparto del nifedipino se realiza como se describe en los puntos anteriores de este apartado.

e) Coefficientes de reparto de nifedipino en IPM/agua en presencia de PG (cotensioactivo múltiple microemulsión o/a/o) y en función de la cantidad de fase interna incorporada a la microemulsión múltiple o/a/o: los ensayos se realizan a partir de microemulsiones múltiples constituidas por 30% Brij® 96/PG, a una relación fija 3:1 (p/p), y una proporción variable de fase interna (microemulsión primaria o/a) en el intervalo comprendido entre el 5 y el 20% en peso.

Se adicionan las siguientes cantidades de fase interna (microemulsión primaria o/a sin tensioactivo): 1,25, 2,5, 3,75 y 5 ml a 1,8 ml de PG, y a distintas cantidades de fase externa de la microemulsión múltiple (IPM): 19,3, 17,5, 16,1 y 14,6 ml.

Se mantienen en todos los casos la composición cuantitativa y cualitativa de las formulaciones desarrolladas en el apartado 6.2.1. La determinación de los coeficientes de reparto del nifedipino se realiza como se describe en los puntos anteriores de este apartado.

- Resultados y comentarios:

La tabla 54 muestra los coeficientes de reparto del principio activo en distintos sistemas:

Composición cualitativa	Coefficientes de partición (P) (n=3)
Octanol/tampón fosfato (0,2 M pH=7,4)	$P_{\text{Oct /tampón fosfato}} = 413,78 \pm 3,81$
Octanol/agua	$P_{\text{Oct/agua}} = 315,72 \pm 3,46$
IPM/tampón fosfato (0,2 M pH=7,4)	$P_{\text{IPM}} = 37,38 \pm 2,06$
IPM/agua	$P_{\text{IPM/agua}} = 52,41 \pm 1,97$
IPM/agua/propilenglicol	$P_{\text{cos}} = 4,33 \pm 0,69$
IPM/agua/propilenglicol (11,66% v/v)	$P_{2:1 \text{ Brij® 96/PG}} = 1,17 \pm 1,05$
IPM/agua/propilenglicol/PEG 400 (8,75% v/v)	$P_{3:1 \text{ Brij® 96/PG}} = 1,29 \pm 0,91$
IPM/agua/propilenglicol (7% v/v)	$P_{4:1 \text{ Brij® 96/PG}} = 3,17 \pm 1,35$
IPM/agua/propilenglicol/PEG 400 (7,5% v/v)	$P_{30\% \text{ Brij® 96/PG}} = 2,04 \pm 1,16$
IPM/agua/propilenglicol/PEG 400 (8,75% v/v)	$P_{35\% \text{ Brij® 96/PG}} = 1,66 \pm 0,99$
IPM/agua/propilenglicol/PEG 400 (10% v/v)	$P_{40\% \text{ Brij® 96/PG}} = 0,94 \pm 0,43$
IPM/agua/propilenglicol/PEG 400 (11,25% v/v)	$P_{45\% \text{ Brij® 96/PG}} = 0,79 \pm 0,16$
IPM/agua /propilenglicol (5% v/v fase interna)	$P_{5\% \text{ fase interna}} = 0,48 \pm 0,06$
IPM/agua/propilenglicol (10% v/v fase interna)	$P_{10\% \text{ fase interna}} = 1,59 \pm 0,08$
IPM/agua/propilenglicol (15% v/v fase interna)	$P_{15\% \text{ fase interna}} = 2,55 \pm 0,19$
IPM/agua/propilenglicol (20% v/v fase interna)	$P_{20\% \text{ fase interna}} = 8,83 \pm 0,61$

Tabla 54. Coeficientes de reparto de nifedipino en sistemas octanol/agua, octanol/tampón fosfato pH=7,4, IPM/agua, IPM/tampón fosfato pH=7,4, IPM/agua/PG (según la relación y contenido total tensioactivo/cotensioactivo y fase interna de las microemulsiones múltiples o/a/o constituidas por microemulsión primaria (o/a)/Brij 96/PEG 400/IPM).

El nifedipino es una molécula que no se encuentra en estado ionizado a pH fisiológico. La solubilidad del nifedipino en agua es $2,4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ y su solubilidad en

octanol de $7,3 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Los coeficientes de reparto determinados en octanol/agua y octanol/tampón fosfato (0,2 M pH=7,4) (Tabla 40) presentan valores de $\log P$ de 2,50 y 2,62, respectivamente. Estos valores están en concordancia con los obtenidos en otros trabajos publicados por otros autores (McDaid y Deasy, 1996).

Existe un valor de óptimo de $\log P$ para la mayoría de los compuestos que particionan a través de membranas lipófilas. Se ha comprobado que compuestos con valores bajos de $\log P$ no atraviesan el estrato córneo, mientras que aquellos con altos valores de $\log P$ se mantienen disueltos en el estrato córneo. Los valores de $\log P$ obtenidos para el nifedipino permiten concluir que esta molécula es idónea para que se absorba de manera efectiva a través de la piel, ya que son del mismo orden que los que presentan otras moléculas como el trinitrato de glicerilo (2,05), clordiazepóxido (2,50) y el timolol (1,91). Estos principios activos se absorben a través de la piel alcanzando la circulación sistémica en una extensión y magnitud adecuada para conseguir un efecto terapéutico.

Los altos valores de los coeficientes de reparto, de nifedipino, determinados en IPM/agua y IPM/ tampón fosfato pH=7,4, demuestran la lipofilia de nuestro principio activo. Además, permiten suponer que el nifedipino se puede incorporar perfectamente en la fase interna de la microemulsión primaria o/a y , posteriormente, particionar hacia la fase externa de las microemulsiones múltiples o/a/o.

Como se puede observar en la tabla 54, a medida que aumenta la relación tensioactivo/cotensioactivo y el porcentaje de fase interna se incrementa la partición del principio activo hacia el IPM. Este efecto se puede explicar, en el primer caso, por la disminución en la incorporación de PG presente en las formulaciones y en el segundo caso, por una dilución de la concentración de PG, ya que la fase interna (microemulsión primaria o/a) presenta agua como componente mayoritario. En este tipo de microemulsiones múltiples, el PEG 400 es el responsable de facilitar la partición del principio activo hacia la fase acuosa debido a su elevada solubilidad en este solvente.

Por el contrario, al incrementar el contenido total Brij[®] 96/PG, aumenta la partición de principio activo hacia la fase acuosa, disminuyendo por lo tanto el coeficiente de reparto. Este efecto se debe al incremento en el porcentaje incorporado de PG, ya que aumenta el contenido total tensioactivo/cotensioactivo, que es el responsable como se ha comentado anteriormente, de facilitar la partición del nifedipino al medio acuoso.

6.2.3.- Estudios de cesión *in vitro*

- Método:

Los estudios de absorción *in vitro* a través de membranas artificiales se realizan con las microemulsiones múltiples o/a/o desarrolladas en el apartado 6.2.1. En estos estudios se evalúa la influencia de distintos parámetros sobre la absorción *in vitro* de nifedipino desde los sistemas dispersos objeto de estudio:

- a) Influencia de la incorporación de distintas cantidades de nifedipino en la fase externa de las microemulsiones múltiples o/a/o.

- b) Influencia de la relación Brij® 96/PG de las microemulsiones múltiples o/a/o.
- c) Influencia del contenido total Brij® 96/PG de las microemulsiones múltiples o/a/o.
- d) Influencia del contenido total de fase interna de las microemulsiones múltiples o/a/o.

Los equipos y las condiciones empleadas en los estudios de cesión in vitro, con este tipo de microemulsiones múltiples, son los mismos que los utilizados en el apartado 6.1.3 de este capítulo. El tratamiento de los datos y el análisis estadístico de los resultados obtenidos en los estudios de cesión in vitro se han descrito detalladamente en el apartado 6.1.3.

- Resultados y comentarios:

La cesión de nifedipino desde las microemulsiones múltiples o/a/o se encuentra regulada principalmente por la transferencia del fármaco desde la fase dispersa a la fase continua y por la difusión del principio activo a través de la membrana desde la fase continua al medio receptor (condiciones sink).

La difusión de nifedipino desde la fase interna a la externa en las microemulsiones múltiples o/a/o se encuentra influenciada por tres posibles mecanismos:

-1) La formación “in situ” de micelas inversas en las fases oleosas que constituyen el sistema disperso objeto de estudio. La validez de este mecanismo depende de la naturaleza del tensioactivo que forma la micela. Se ha demostrado que las micelas inversas se forman en la fase oleosa de sistemas dispersos estabilizados por tensioactivos monoméricos, como es el caso del Brij® 96 (Sela Y. y cols., 1995). En este caso el transporte de nifedipino a través de micelas inversas sería uno de los posibles mecanismos que facilitaría la migración del fármaco desde la fase interna oleosa a la fase externa oleosa.

- 2) La presencia del cotensioactivo (propilenglicol) que forma parte de las microemulsiones, desempeña un papel importante en la cesión del nifedipino desde la microemulsión múltiple o/a/o. Este solvente facilita la partición del principio activo desde las distintas fases que constituyen el sistema disperso debido a la elevada solubilidad del nifedipino en propilenglicol.

- 3) La fuerza conductora que ejerce la fase externa oleosa (IPM) sobre el nifedipino (molécula de marcado carácter lipófilo) localizado en la fase interna, facilitando la partición del principio activo desde la fase oleosa a la acuosa de la microemulsión primaria y, posteriormente, hacia la fase dispersa de la microemulsión múltiple o/a/o.

Las diferencias encontradas en las cinéticas de cesión del principio activo desde microemulsiones múltiples o/a/o, con distinta composición cualitativa de los componentes que constiuyen la formulación, se pueden atribuir a los coeficientes de reparto del

nifedipino entre la fase acuosa y las fases oleosas. No es posible determinar el coeficiente de reparto real del principio activo entre las fases oleosas y la fase acuosa de la microemulsiones múltiple debido a la alta estabilidad de estos sistemas dispersos. Por lo tanto, se determinan los coeficientes de reparto del nifedipino entre la fase acuosa y las fases oleosas en presencia del cotensioactivo que constituye la formulación (propilenglicol). Los coeficientes de reparto se utilizan como una aproximación de la partición del principio activo dentro de la microemulsión múltiple.

a) Influencia de la concentración de nifedipino incorporado en la fase externa sobre la cesión in vitro del principio activo desde microemulsiones múltiples o/a/o.

La figura 106 representa la cantidad cedida acumulada de nifedipino, en función del tiempo, desde diferentes microemulsiones múltiples o/a/o, constituidas por microemulsión primaria (o/a)/Brij® 96/PG/IPM en proporciones 20/30/50 (p/p/p) con una relación fija Brij® 96/PG de 3:1.

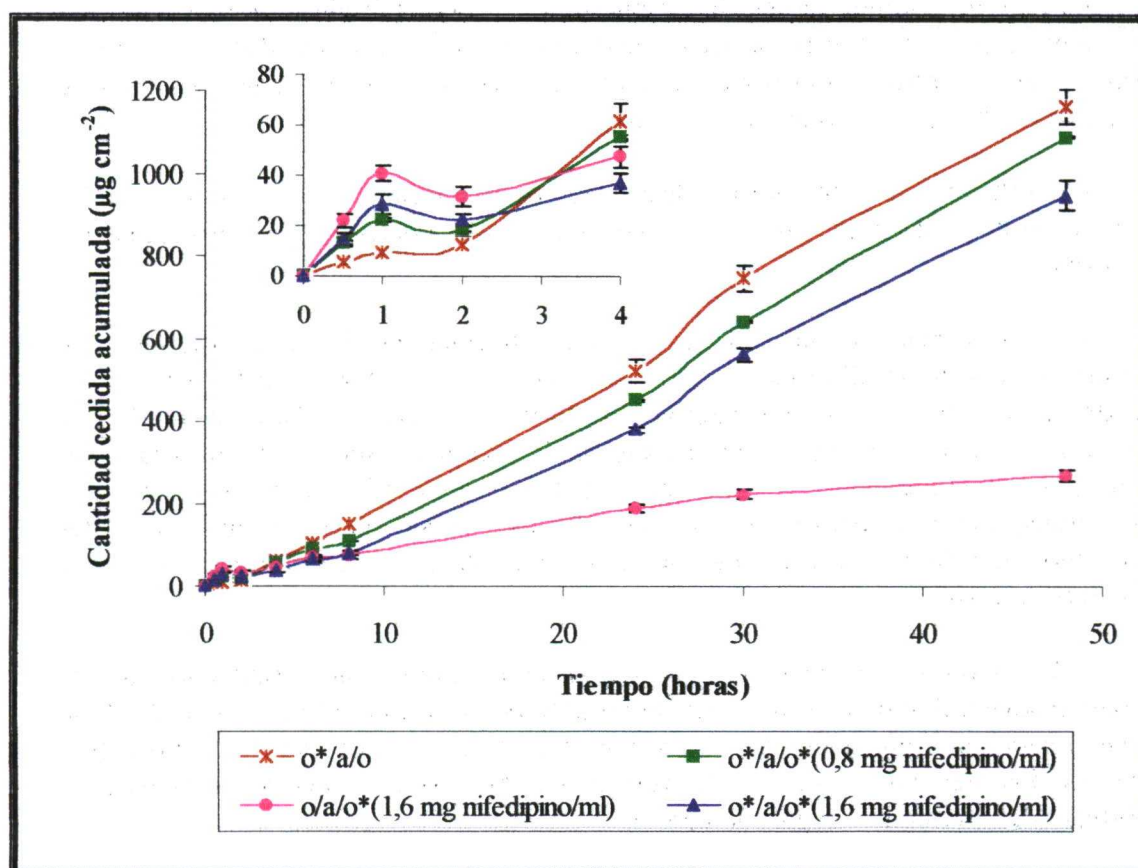


Figura 106. Perfiles de cesión in vitro de nifedipino desde microemulsiones múltiples o/a/o (microemulsión primaria (o/a)/Brij® 96/PG/IPM; 20/30/50, p/p/p) con 36 mg de nifedipino incorporado en fase interna y distintas concentraciones de nifedipino en fase externa (0, 0,8 y 1,6 mg·ml⁻¹), y una formulación control (microemulsión primaria (o/a)/Brij® 96/PG/IPM; 20/30/50, p/p/p) con 1,6 mg·ml⁻¹ de nifedipino en la fase externa.

En todas las formulaciones se mantiene constante la cantidad de principio activo incorporado en la fase interna, ya que el porcentaje de fase interna presente en las microemulsiones múltiples es el mismo (20 % de fase interna con una concentración de

nifedipino de $18 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Sin embargo, la concentración de nifedipino incorporado en la fase externa varía.

Se estudia la incorporación de distintas concentraciones de nifedipino en la fase continua de la microemulsión múltiple o/a/o, con el fin de evaluar el efecto que ejerce el aumento de dicha concentración sobre los perfiles de cesión del principio activo desde la formulación seleccionada

La incorporación de nifedipino en la fase continua ($0,8$ y $1,6 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de nifedipino) de las microemulsiones múltiples o*/a/o* favorece la cesión de nifedipino a través de la membrana artificial durante las dos horas primeras de ensayo. La cantidad cedida de nifedipino desde los sistemas dispersos, con $0,8$ y $1,6 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de nifedipino en la fase continua, es del orden de $2,1$ y $3,2$ veces superior, respectivamente, a la hora de ensayo y de $1,6$ y $1,8$ veces superior, respectivamente, a las dos horas de ensayo, en relación a la microemulsión múltiple o*/a/o. Este hecho se puede explicar en el caso de las microemulsiones múltiples o*/a/o* por la rápida difusividad del principio activo localizado en la fase externa hacia el compartimento receptor. Por el contrario, en la microemulsión múltiple o*/a/o el nifedipino tiene que difundir, durante las primeras horas de ensayo, desde la fase interna a la externa del sistema disperso.

A partir de las dos horas hasta la finalización del de ensayo existe un aumento de la cesión de nifedipino desde microemulsiones múltiples o*/a/o en cuanto a velocidad y magnitud respecto a los sistemas o*/a/o*. A las 24 horas las cantidades cedidas acumuladas de nifedipino desde las microemulsiones múltiples o*/a/o, o*/a/o* ($0,8 \text{ mg de nifedipino/ml}$) y o*/a/o* ($1,6 \text{ mg de nifedipino/ml}$) son de $524,0$, $449,5$ y $379,2 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, respectivamente. Mientras que, a las 48 horas de ensayo las cantidades cedidas de nifedipino desde las microemulsiones múltiples o*/a/o, o*/a/o* ($0,8 \text{ mg de nifedipino/ml}$) y o*/a/o* ($1,6 \text{ mg de nifedipino/ml}$) son de $1163,1$, $1089,3$ y $947,6 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, respectivamente. La mayor cesión de nifedipino desde microemulsiones múltiples o*/a/o se debe a que la fase externa se encuentra totalmente disponible para la solubilización del nifedipino, facilitando su partición hacia la fase continua, al incrementar la fuerza de conducción sobre el principio activo localizado en la fase interna. Todo esto se traduce en una mayor difusión del principio activo a través de la membrana. Lo comentado anteriormente se puede aplicar a las microemulsiones múltiples o*/a/o* ($1,6 \text{ mg de nifedipino/ml}$) y o*/a/o* ($0,8 \text{ mg de nifedipino/ml}$) para explicar la mayor cesión de principio activo desde aquellos sistemas con mayor disponibilidad de fase externa para la partición del nifedipino.

Con el fin de evaluar el efecto reservorio de las microemulsiones múltiples desarrolladas, se estudia la cesión de nifedipino desde estas formulaciones durante las 48 horas que dura el ensayo y se compara con la cesión de nifedipino desde una formulación control (múltiple microemulsión o/a/o* ($1,6 \text{ mg de nifedipino/ml}$)). Como se puede observar en la figura anterior, en las microemulsiones múltiples o*/a/o y o*/a/o* se obtienen perfiles de cesión del principio activo que se pueden ajustar a cinéticas de orden cero mientras que, la cesión de nifedipino desde la formulación control se ajusta a una cinética de orden uno. El distinto comportamiento en la cesión desde los sistemas dispersos o*/a/o y o*/a/o* respecto a la formulación control se debe, por un lado, a que la fase externa oleosa de la microemulsión múltiple ayuda a la partición del nifedipino

desde la fase interna a la externa y por otro lado, al efecto reservorio del principio activo localizado en la fase interna oleosa, que permite un gradiente de concentración positivo hacia la fase externa y de aquí al compartimento receptor.

En la tabla 55 se recogen los porcentajes de nifedipino cedidos a las 24 y 48 horas desde las distintas formulaciones:

Formulación	Cantidad cedida (% Dosis)		
	1 h	24 h	48 h
<i>o/a/o*</i> (Control)	10,47±0,51	48,40±2,04	67,93±3,06
<i>o*/a/o</i>	0,52±0,11	29,99±1,62	63,55±2,97
<i>o*/a/o*</i> (0,8 mg de nifedipino/ml)	1,15 ±0,16	26,29±1,34	59,44±2,31
<i>o*/a/o*</i> (1,6 mg de nifedipino/ml)	0,99 ±0,14	17,75±0,97	44,37±1,91

Tabla 55. Porcentajes de nifedipino cedidos desde microemulsiones múltiples o/a/o a distintos tiempos en función de la cantidad de nifedipino incorporada en la fase interna y externa.

Al comienzo del ensayo, la mayor cesión de nifedipino a través de la membrana de PVDF corresponde a las microemulsiones múltiples con nifedipino incorporado en la fase externa. Sin embargo, la formulación control es la que cede mayor porcentaje de la dosis inicial, ya que la difusión del principio activo localizado en la fase externa no se encuentra regulada por la cantidad de nifedipino que difunde desde la fase interna a la externa. Al realizar un análisis estadístico de varianza (ANOVA) del porcentaje cedido de nifedipino desde los sistemas dispersos *o*/a/o*, *o*/a/o** (0,8 mg de nifedipino/ml) y *o*/a/o** (1,6 mg de nifedipino/ml), se observan diferencias estadísticamente significativas a la hora de ensayo entre las microemulsiones múltiples *o*/a/o* y *o*/a/o** (0,8 mg de nifedipino/ml).

Como se puede observar, a las 24 y 48 horas de ensayo el mayor porcentaje cedido de la dosis administrada sigue correspondiendo a la formulación control. De las microemulsiones múltiples con principio activo incorporado en la fase interna es el sistema disperso *o*/a/o* el que cede mayor porcentaje de nifedipino. Por lo tanto, se puede concluir que a medida que disminuye la cantidad de nifedipino incorporada en la fase externa, aumenta la fuerza de conducción que dicha fase ejerce sobre el principio activo localizado en la fase interna. De esta manera, se favorece la partición del nifedipino hacia la fase externa dando lugar a un mayor porcentaje de nifedipino cedido.

A las 24 horas de ensayo el porcentaje cedido de nifedipino desde las microemulsiones múltiples *o*/a/o*, *o*/a/o** (0,8 mg de nifedipino/ml) y *o*/a/o** (1,6 mg de nifedipino/ml) está comprendido entre el 17,8 y el 30%. Al realizar un ANOVA, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes cedidos desde los sistemas dispersos *o*/a/o* y *o*/a/o** (0,8 mg de nifedipino/ml).

A las 48 horas de ensayo, el porcentaje cedido de nifedipino desde las microemulsiones múltiples *o*/a/o*, *o*/a/o** (0,8 mg de nifedipino/ml) y *o*/a/o** (1,6 mg de nifedipino/ml) está comprendido entre el 44,4 y el 63,6 %. No se aprecian diferencias estadísticamente significativas al realizar un ANOVA entre los porcentajes cedidos desde las microemulsiones múltiples *o*/a/o* y *o*/a/o** (0,8 mg de nifedipino/ml).

La tabla 56 muestra los coeficientes de permeabilidad y los tiempos de latencia de las microemulsiones múltiples o/a/o objeto de estudio.

Microemulsión múltiple	$K_p \cdot 10^3 \text{ (cm} \cdot \text{h}^{-1})$	$t_l \text{ (horas)}$
o/a/o* (Control)	12,37±0,113	0,022 ±0,002
o*/a/o	5,09±0,033	0,591 ±0,009
o*/a/o* (0,8 mg de nifedipino/ml)	4,41±0,027	0,093 ±0,002
o*/a/o* (1,6 mg de nifedipino/ml)	3,38±0,029	0,067 ±0,002

Tabla 56. Coeficientes de permeabilidad (K_p) y tiempos de latencia (t_l) de las microemulsiones múltiples o/a/o (microemulsión primaria o/a/Brij® 96/PG/IPM; 20/30/50; p/p/p) en función de la concentración de nifedipino presente en la fase interna y externa.

Los coeficientes de permeabilidad se calculan a partir del flujo obtenido en el estado estacionario considerando la concentración total de fármaco presente en los sistemas dispersos.

Es interesante destacar que los K_p obtenidos desde las microemulsiones múltiples o*/a/o, o*/a/o* (0,8 mg de nifedipino/ml) y o*/a/o* (1,6 mg de nifedipino/ml) están relacionados con la fuerza de conducción que ejerce la fase externa sobre el nifedipino localizado en la fase interna. Por lo tanto, esta fuerza de conducción es mayor en aquellas microemulsiones múltiples con menor saturación de nifedipino en la fase continua dando lugar a un mayor K_p .

La formulación control presenta el mayor K_p debido a que todo el nifedipino localizado en la fase externa está disponible para la absorción y dicha cesión no está regulada por la presencia de principio activo localizado en la fase interna.

La incorporación de nifedipino en la fase externa de las microemulsiones múltiples disminuye considerablemente el tiempo necesario para que el principio activo atraviese la membrana lipófila y alcance el compartimento receptor. En este tipo de formulaciones, el nifedipino no tiene que difundir desde la fase dispersa a la fase continua para que se produzca la absorción. En la formulación control, el tiempo de latencia es muy pequeño debido a la rápida cesión del principio activo incorporado en la fase externa que, como se ha comentado anteriormente, no se encuentra regulada por la presencia de nifedipino en la fase interna.

La figura 107 representa los flujos de nifedipino desde las microemulsiones múltiples objeto de estudio. Como se puede observar, en todas las formulaciones se alcanza el flujo máximo entre las 0,5 y 1 hora de ensayo. Los máximos valores de este parámetro se obtienen desde los sistemas dispersos o/a/o* (44,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) y o*/a/o* (0,8 mg de nifedipino/ml) (25,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$). Posteriormente, en todas las microemulsiones múltiples se produce una disminución del flujo. En el caso de la formulación control, el flujo disminuye hasta la finalización del ensayo debido a que la dosis incorporada es muy pequeña y no se alcanza el estado estacionario. En las microemulsiones múltiples o*/a/o y o*/a/o* (0,8 mg de nifedipino/ml) se produce una disminución de este parámetro a las 2 horas de ensayo con valores de 6,0 y 9,4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, respectivamente. En el sistema

disperso o*/a/o* (1,6 mg de nifedipino/ml) el flujo disminuye hasta las 4 horas con un valor de $9,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$.

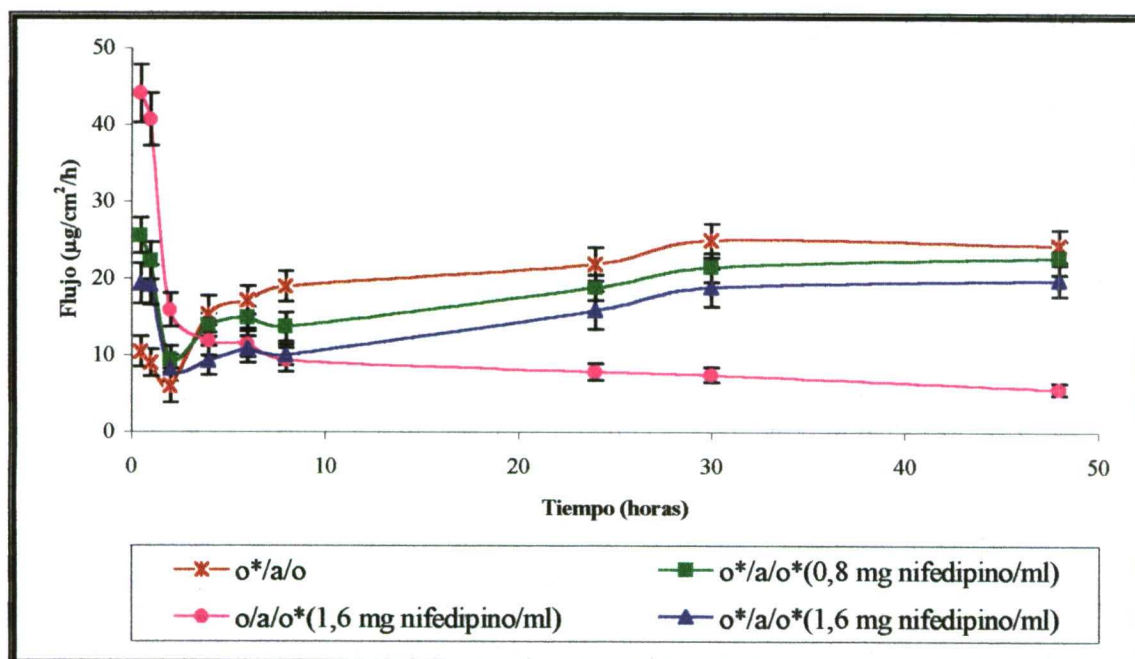


Figura 107. Flujos de nifedipino a través de la membrana PVDF desde las microemulsiones múltiples o*/a/o, o*/a/o* (0,8 mg de nifedipino/ml), o*/a/o* (1,6 mg de nifedipino/ml) y o/a/o* en función del tiempo.

En la microemulsión múltiple o*/a/o, el flujo aumenta progresivamente desde las 4 hasta las 30 horas de ensayo ($24,9 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$), para mantenerse, posteriormente, constante hasta la finalización del mismo. Sin embargo, en la microemulsión múltiple o*/a/o* (0,8 mg de nifedipino/ml) el flujo incrementa desde las 4 a las 48 horas de ensayo alcanzando valores de flujo de $22,7 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. Por último, en la microemulsión múltiple o*/a/o* (1,6 mg de nifedipino/ml), el flujo aumenta progresivamente desde las 6 hasta las 48 horas de ensayo alcanzando un valor máximo de $19,7 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$.

Los flujos en el estado estacionario para las microemulsiones múltiples o*/a/o, o*/a/o* (0,8 mg de nifedipino/ml), o*/a/o* (1,6 mg de nifedipino/ml), y o/a/o* son de 18,3, 16,3, 14,9 y $9,9 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, respectivamente.

b) Influencia de la relación Brij® 96/PG sobre la cesión in vitro de nifedipino desde microemulsiones múltiples o/a/o.

La figura 108 muestra la cantidad cedida acumulada de nifedipino desde diferentes microemulsiones múltiples o/a/o constituidas por microemulsión primaria (o/a)/Brij® 96/PG/IPM; 10/35/55, p/p/p) con variación en la relación Brij 96/PG en el intervalo comprendido entre 2:1 y 4:1. Como formulación control se desarrolla la misma microemulsión múltiple en ausencia de cotensioactivo (PG).

En todas las formulaciones se mantiene constante la concentración de nifedipino presente en la fase interna ($18 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) y externa ($0,8 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Todas las

formulaciones presentan el mismo porcentaje de fase interna y externa por lo que las cantidades de nifedipino son las mismas.

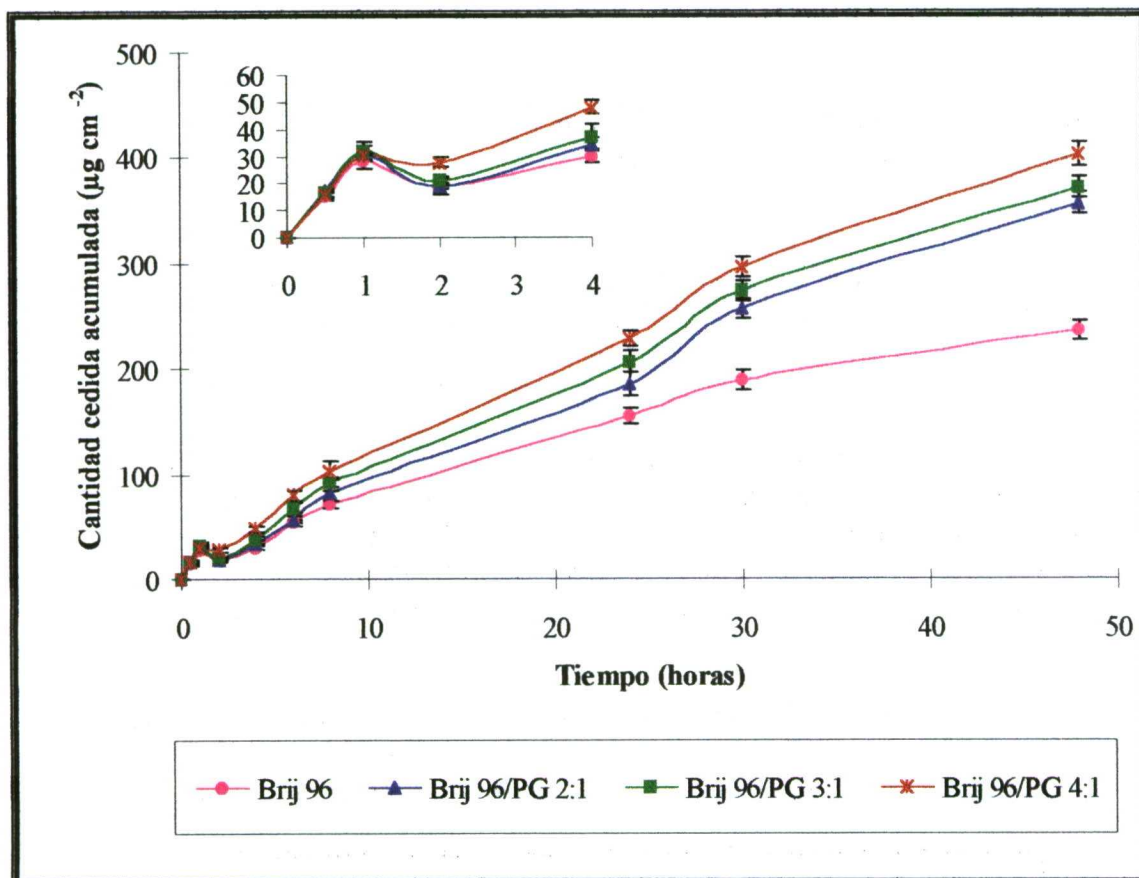


Figura 108. Perfiles de cesión *in vitro* de nifedipino desde microemulsiones múltiples o/a/o (microemulsión primaria (o/a)/Brij® 96/PG/IPM 10/35/55, p/p/p,) con 18 mg·ml⁻¹ de nifedipino en fase interna y 0,8 mg·ml⁻¹ de nifedipino en fase externa en función de la relación Brij® 96/PG.

En este ensayo se evalúa la influencia que ejerce la relación Brij® 96/PG sobre la cesión de nifedipino desde las microemulsiones múltiples constituidas por un 10% en peso de microemulsión primaria (fase interna), 35% en peso de Brij® 96/PG y 55% en peso de IPM. Como se puede observar, al aumentar la relación Brij® 96/PG se incrementa la cantidad de nifedipino que se absorbe a través de la membrana artificial lipófila. Este efecto se observa desde las primeras horas de ensayo, aunque de forma más significativa a medida que transcurre el mismo. Los perfiles de cesión del principio activo que se obtienen desde las microemulsiones múltiples o/a/o se ajustan a cinéticas de orden cero.

En la tabla 57 se muestran los coeficientes de permeabilidad (K_p) de nifedipino desde las microemulsiones múltiples. Los K_p se calculan a partir del flujo obtenido en el estado estacionario teniendo en cuenta la concentración total de nifedipino presente en los sistemas dispersos (2,24 mg·ml⁻¹). Con el fin de normalizar los datos de permeabilidad para cada microemulsión múltiple con respecto a la formulación control, se calcula el incremento la permeabilidad (IP) según la siguiente ecuación (Moreno y cols, 2000):

$$IP = \frac{K_{pBrij96/PG}}{K_{pcontrol}}$$

Microemulsión múltiple	$K_p \cdot 10^3 \text{ (cm} \cdot \text{h}^{-1})$	IP
Control (sin PG)	$3,41 \pm 0,024$	1
Brij® 96/PEG 400 2:1	$3,96 \pm 0,032$	1,16
Brij® 96/PEG 400 3:1	$4,30 \pm 0,029$	1,28
Brij® 96/PEG 400 4:1	$5,15 \pm 0,042$	1,51

Tabla 57. Coeficientes de permeabilidad (K_p) e incrementos de permeabilidad (IP) de nifedipino desde las microemulsiones múltiples o/a/o (microemulsión primaria o/a/Brij® 96/PG/IPM; 10/35/55; p/p/p) en función de la relación tensioactivo/cotensioactivo.

De los datos obtenidos se puede concluir que al aumentar la relación Brij® 96/PG en las microemulsiones múltiples, incrementa la permeabilidad de nifedipino a través de la membrana artificial lipófila. El valor de K_p más alto corresponde a la microemulsión múltiple con una relación tensioactivo/cotensioactivo 4:1, dando lugar a un incremento de la permeabilidad de 1,5 veces superior respecto a la formulación control.

Los K_p de nifedipino obtenidos, desde las microemulsiones múltiples objeto de estudio, presentan una buena linealidad respecto a los coeficientes de reparto calculados para cada sistema disperso en función de la relación Brij® 96/PG (Figura 109).

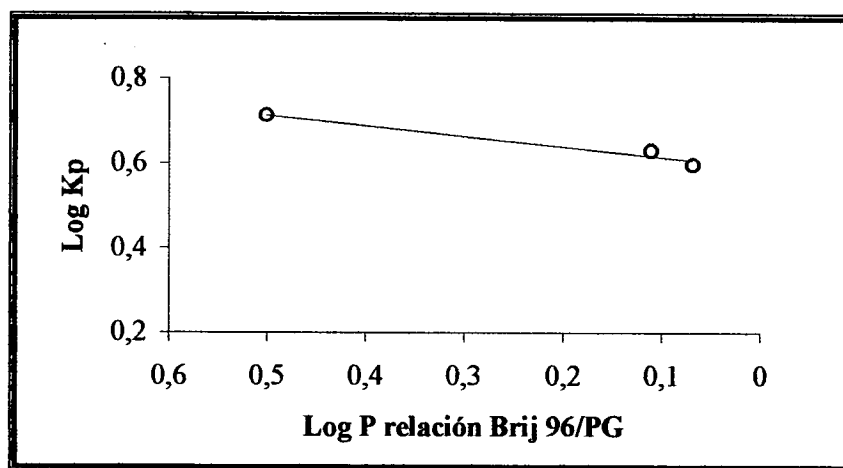


Figura 109. Logaritmos de los coeficientes de permeabilidad a través de la membrana artificial lipófila desde microemulsiones múltiples o/a/o con variación en la relación Brij® 96/PG frente a los logaritmos de sus respectivos coeficientes de reparto.

De esta figura se deduce que a medida que aumenta el coeficiente de reparto lo hace la constante de permeabilidad. Por lo tanto, debido a la relación lineal existente entre los K_p y los coeficientes de reparto, las diferencias que existen en las cantidades cedidas de nifedipino desde las distintas microemulsiones múltiples se pueden explicar mediante los coeficientes de reparto del principio activo entre la fase oleosa y la fase acuosa que constituyen los sistemas estudiados.

Los valores de los coeficientes de reparto del nifedipino entre IPM y agua, en presencia de PG según la relación Brij® 96/PG, sugieren que el efecto observado sobre la cesión del nifedipino desde los sistemas dispersos, a través de la membrana artificial, puede deberse al PG. Esta suposición está reforzada por los resultados de solubilidad del nifedipino en PG y en sistemas constituidos por Brij® 96/PG expuestos en el apartado 4.3.6.

Así, al disminuir la relación tensioactivo/cotensioactivo se favorece la partición del nifedipino desde la fase oleosa a la fase acuosa de la microemulsión primaria, debido a la presencia de una mayor cantidad de PG en la formulación. Por este mismo motivo, la posterior partición del nifedipino desde la fase acuosa hacia la fase externa oleosa de la microemulsión se verá dificultada.

No obstante, es interesante destacar que el PG desempeña un papel fundamental en la partición del nifedipino desde la fase interna oleosa (microemulsión primaria o/a) a la fase externa oleosa para su posterior difusión a través de la membrana. Esto se puede corroborar por el hecho de que en todas las microemulsiones múltiples con una variación en la relación tensioactivo/cotensioactivo, comprendida dentro del intervalo 2:1 a 4:1, se obtienen valores de K_p mayores que el de la formulación control (sin PG).

En la tabla 58 se muestran los porcentajes de nifedipino cedidos, a distintos tiempos, desde las microemulsiones múltiples en función de la relación Brij® 96/PG.

<i>Microemulsión múltiple</i>	<i>Cantidad cedida (% Dosis)</i>		
	<i>1 h</i>	<i>24 h</i>	<i>48 h</i>
<i>Control (sin PEG 400)</i>	2,65 ±0,16	14,41±0,71	21,02±0,98
<i>Brij® 96/PEG 400 2:1</i>	2,93 ±0,19	17,29±0,79	33,19±1,06
<i>Brij® 96/PEG 400 3:1</i>	2,96 ±0,27	20,01±0,81	34,55±1,78
<i>Brij® 96/PEG 400 4:1</i>	2,86 ±0,18	21,24±1,23	37,52±1,53

Tabla 58. Porcentaje de nifedipino cedido desde microemulsiones múltiples o/a/o a distintos tiempos en función de la relación tensioactivo/cotensioactivo.

El porcentaje cedido de la dosis inicial de nifedipino, a la primera hora de ensayo, desde las microemulsiones múltiples o/a/o está comprendido entre el 2,7 y 3,0%. Al realizar un estudio estadístico de varianza (ANOVA) no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes cedidos de nifedipino desde la formulación control y el resto de microemulsiones múltiples.

A las 24 y 48 horas de ensayo el mayor porcentaje de nifedipino cedido corresponde a aquellas microemulsiones múltiples con mayor relación tensioactivo/cotensioactivo, como ocurre a la hora de ensayo.

Los porcentajes cedidos de nifedipino a las 24 horas, desde los distintos sistemas dispersos, están comprendidos entre 14,4 y 21,2%. Al realizar un ANOVA no se observan diferencias estadísticamente significativa entre los porcentajes cedidos de nifedipino desde los sistemas dispersos con una relación Brij® 96/PG 2:1 y 3:1. Tampoco se observan diferencias estadísticamente significativas entre los sistemas dispersos con una relación Brij® 96/PG 3:1 y 4:1. A las 48 horas, los porcentajes

cedidos de nifedipino están comprendidos entre el 21,0 y 37,5%. Al realizar un análisis estadístico de varianza (ANOVA) no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los sistemas dispersos con una relación Brij® 96/PG 2:1 y 3:1 y entre los sistemas dispersos con una relación Brij® 96/PG 3:1 y 4:1.

Los tiempos de latencia obtenidos para los distintos sistemas son muy similares entre sí y están comprendidos entre $1 \cdot 10^{-2}$ y $5 \cdot 10^{-2}$ horas. Esto se debe a que todas las microemulsiones múltiples presentan el mismo porcentaje de fase externa con un contenido de principio activo de $0,8 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$.

La figura 110 representa los flujos de nifedipino desde las microemulsiones múltiples o/a/o con variación en la relación Brij® 96/PG.

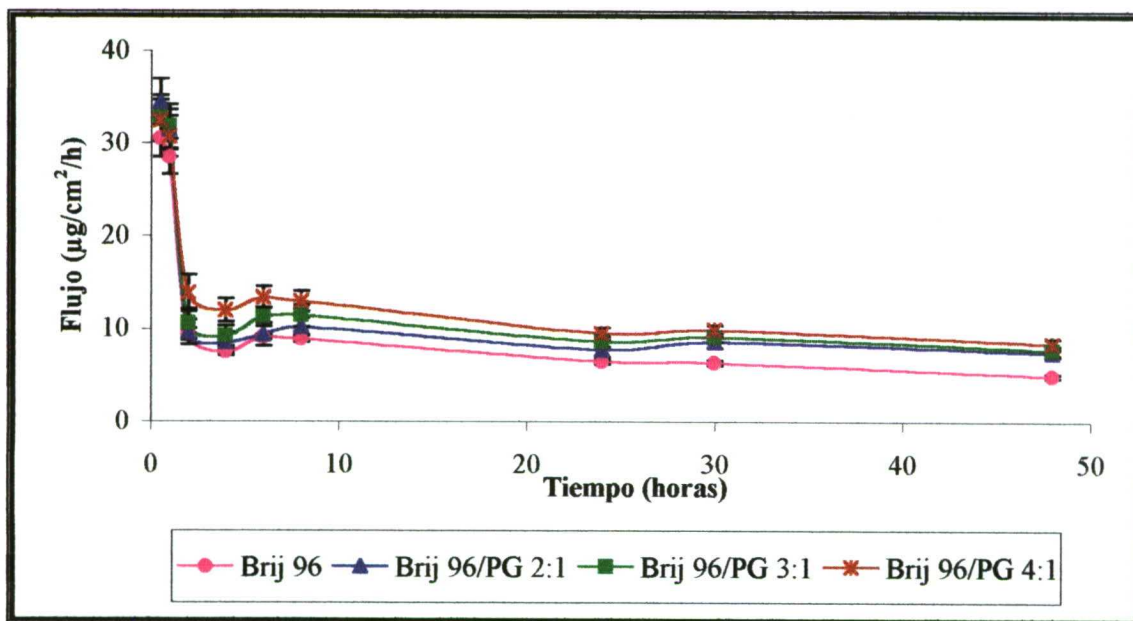


Figura 110. Flujos de nifedipino a través de la membrana PVDF desde microemulsiones múltiples o/a/o (microemulsión primaria (o/a)/Brij® 96/PG/IPM 10/35/55, p/p/p) con cantidades de nifedipino constantes en la fase interna ($18 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) y externa ($0,8 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) en función de la relación Brij® 96/PG.

Los perfiles de flujo desde las microemulsiones múltiples o/a/o objeto de estudio son muy parecidos entre sí. Estos perfiles se caracterizan por un incremento inicial del flujo, debido a la rápida cesión de nifedipino localizado en la fase externa. Así, a la hora de ensayo los valores de flujo obtenidos desde los distintos sistemas dispersos están comprendidos entre $30,5$ y $34,5 \text{ µg/cm}^2/\text{h}$. A continuación, se produce una disminución significativa de este parámetro hasta las 4 horas de ensayo con valores comprendidos entre $7,4$ y $12 \text{ µg/cm}^2/\text{h}$.

Posteriormente, se produce un aumento del flujo hasta las 6 horas para la formulación control ($9,1 \text{ µg/cm}^2/\text{h}$) y hasta las 8 horas para los sistemas dispersos con una relación tensioactivo/cotensioactivo de 2:1, 3:1 y 4:1, obteniéndose valores de $10,2$, $11,4$ y $12,9 \text{ µg/cm}^2/\text{h}$, respectivamente. Finalmente, en todas las microemulsiones múltiples se produce un descenso del flujo, pasando por una etapa de meseta desde las 24 a las 30 horas, hasta la finalización del ensayo con valores flujo de $4,9$, $7,4$, $7,7$ y $8,4$

$\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ para la formulación control y las microemulsiones múltiples con una relación tensioactivo/cotensioactivo de 2:1, 3:1 y 4:1, respectivamente.

Los flujos en el estado estacionario para las microemulsiones múltiples con una relación Brij® 96/PEG 400 2:1, 3:1, 4:1 y la formulación control (sin PEG 400) son de 8,7, 9,7, 11,4 y 7,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, respectivamente.

c) Influencia del contenido total Brij® 96/PG sobre la cesión in vitro de nifedipino desde microemulsiones múltiples o/a/o.

La figura 111 muestra la cantidad cedida acumulada de nifedipino desde microemulsiones múltiples o/a/o con un contenido fijo en fase interna (10% microemulsión primaria o/a) y una proporción variable del contenido total de Brij® 96/PG, y por lo tanto de fase externa oleosa, comprendido entre el 30 y el 45% en peso con una relación fija tensioactivo/cotensioactivo 3:1 (p/p).

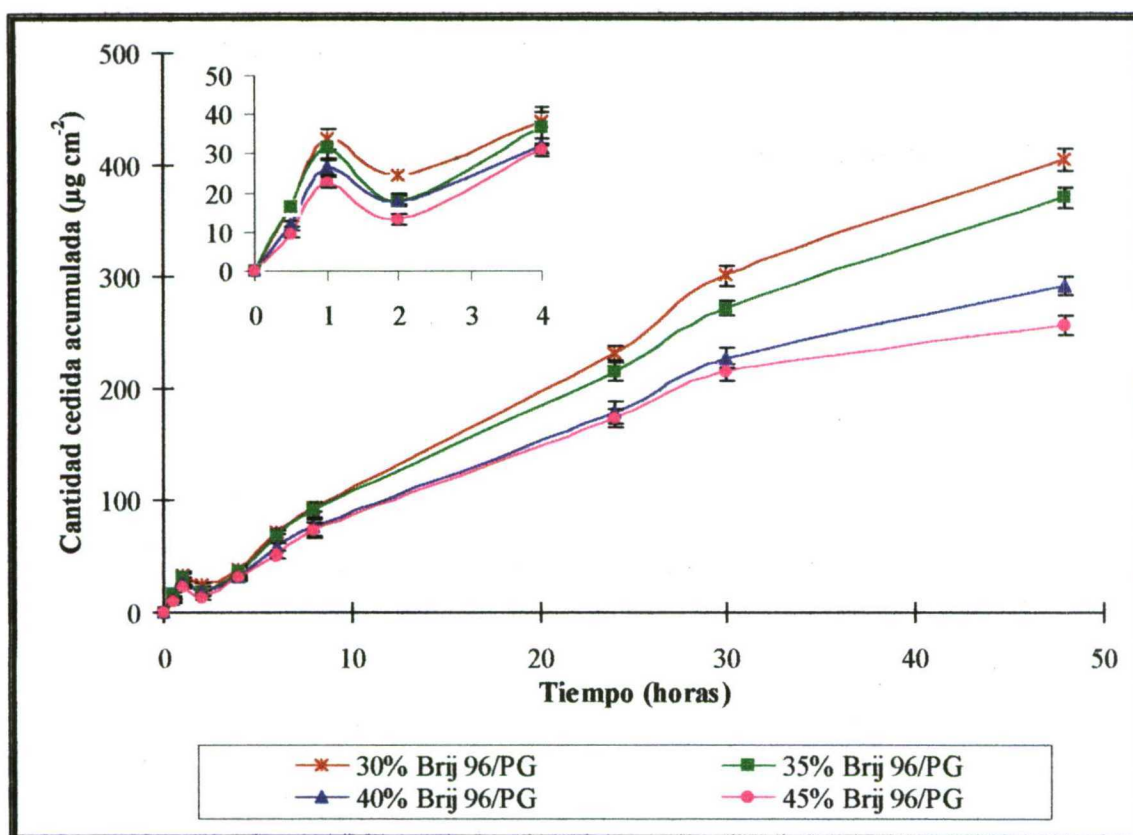


Figura 111. Perfiles de cesión in vitro de nifedipino desde microemulsiones múltiples o/a/o (microemulsión primaria (o/a)/Brij® 96/PG/IPM) con concentraciones de nifedipino en la fase interna de $18 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ y en la fase externa de $0,8 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ en función del contenido total Brij® 96/PG.

En todas las microemulsiones múltiples se mantienen constantes la concentraciones de nifedipino en la fase interna ($18 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) y externa ($0,8 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). La cantidad de nifedipino presente en la fase interna de todos los sistemas dispersos no varía debido a que presentan el mismo porcentaje de fase interna incorporado (10%). Por el contrario, la cantidad de nifedipino presente en la fase externa aumenta a medida que lo hace su porcentaje en las microemulsiones múltiples.

El objetivo de este estudio es evaluar el efecto que ejerce el contenido total Brij® 96/PG sobre la cesión de nifedipino desde las distintas microemulsiones múltiples objeto de estudio. Como se puede apreciar en la figura 111, al aumentar el contenido total Brij® 96/PG disminuye la cantidad de nifedipino que se cede a través de la membrana artificial lipófila. Los perfiles de cesión de nifedipino desde las microemulsiones múltiples con un 30 y 35% de contenido total tensioactivo/cotensioactivo presentan pocas diferencias, al igual que ocurre entre las microemulsiones múltiples con un 40 y 45% de contenido total tensioactivo/cotensioactivo. La disminución en la cesión de nifedipino al aumentar el contenido total Brij® 96/PG se observa desde las primeras horas de ensayo, aunque de forma más significativa a medida que transcurre el mismo. Los perfiles de cesión del principio activo que se obtienen desde las microemulsiones múltiples o/a/o se ajustan a una cinética de orden cero.

En la tabla 59 se muestran los coeficientes de permeabilidad (K_p) de nifedipino desde las microemulsiones múltiples con variación en el contenido total Brij® 96/PG. Los K_p se calculan a partir del flujo obtenido en el estado estacionario, teniendo en cuenta la concentración total de nifedipino presente en cada uno de los sistemas dispersos.

<i>Microemulsión múltiple o/a/o</i>	<i>$K_p \cdot 10^3$ (cm·h⁻¹)</i>
30% Brij® 96/PG	4,67±0,032
35% Brij® 96/PG	4,30±0,029
40% Brij® 96/PG	3,77±0,017
45% Brij® 96/PG	3,53±0,016

Tabla 59. Coeficientes de permeabilidad (K_p) de nifedipino desde microemulsiones múltiples o/a/o (microemulsión primaria (o/a)/Brij® 96/PG/IPM) en función del contenido total tensioactivo/cotensioactivo.

Como se observa en la tabla 59, a medida que aumenta el contenido total Brij® 96/PG disminuyen los K_p de nifedipino desde las microemulsiones múltiples o/a/o. El mayor K_p corresponde a los sistemas dispersos con un 30% tensioactivo/cotensioactivo, siendo este valor de 4,7 cm·h⁻¹.

Los K_p del principio activo obtenidos desde cada microemulsión múltiple o/a/o son bastantes lineales respecto a los coeficientes de reparto IPM/agua, calculados según los porcentajes en fase interna, tensioactivo/cotensioactivo y fase externa presentes en cada microemulsión múltiple (Figura 112). Debido a la relación lineal existente entre ambos parámetros, los coeficientes de reparto del nifedipino entre la fase oleosa y acuosa en presencia de distintas cantidades de PG pueden ser utilizados como una aproximación para evaluar la partición del fármaco dentro de la microemulsión múltiple. De esta manera, se puede explicar las diferencias existentes en las cantidades cedidas de nifedipino desde cada sistema disperso. A la vista de los resultados obtenidos se puede considerar que el PG constituye un factor limitante en la partición del fármaco entre las fases oleosas y la fase acuosa que constituyen la microemulsión múltiple o/a/o. Los resultados de solubilidad del nifedipino en PG y en sistemas Brij 96/PG expuestos en el apartado 4.3.6. de la presente memoria refrendan el papel que ejerce este solvente en la microemulsión múltiple.

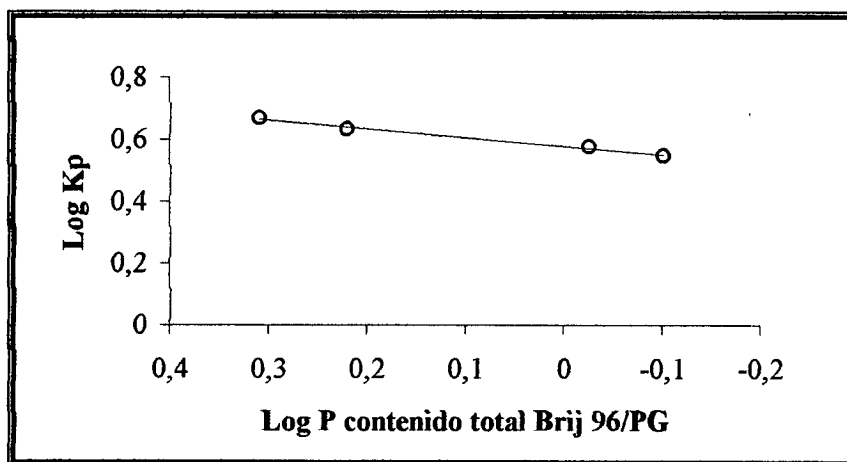


Figura 112. Logaritmos de los coeficientes de permeabilidad a través de la membrana artificial lipófila desde microemulsiones múltiples o/a/o con variación en el contenido total tensioactivo/cotensioactivo frente a los logaritmos de sus respectivos coeficientes de reparto.

Así, el aumento de PG en los sistemas dispersos favorece la partición del fármaco desde fase oleosa a la acuosa de la fase interna (microemulsión primaria o/a). La posterior partición del nifedipino hacia la fase dispersa (IPM) de la microemulsión múltiple se encuentra reducida, al aumentar la cantidad de PG y disminuir el porcentaje de fase externa oleosa. Por consiguiente, se produce una disminución en el K_p y, así mismo, de la cantidad absorbida de principio activo a través de la membrana.

En la tabla 60 se muestran los porcentajes de nifedipino cedidos a distintos tiempos desde las microemulsiones múltiples en función del contenido total Brij® 96/PG.

Microemulsión múltiple o/a/o	Cantidad cedida (% Dosis)		
	1 h	24 h	48 h
30% Brij® 96/PG	3,09±0,24	21,22±0,92	37,06±1,61
35% Brij® 96/PG	2,96±0,27	20,01±0,81	34,55±1,78
40% Brij® 96/PG	2,49±0,18	16,88±0,79	27,68±1,14
45% Brij® 96/PG	2,19±0,17	16,65±0,67	24,69±1,07

Tabla 60. Porcentaje de nifedipino cedido desde microemulsiones múltiples o/a/o a distintos tiempos en función del contenido total Brij® 96/PG.

El porcentaje de nifedipino cedido desde las distintas formulaciones, durante la primera hora de ensayo, está comprendido entre el 2,2 y 3,1%. Al realizar un análisis estadístico (ANOVA) se observa que existen diferencias estadísticamente significativas entre las microemulsiones múltiples con un 30 y 45% tensioactivo/cotensioactivo y entre las microemulsiones múltiples con un contenido total Brij® 96/PG del 35 y 45%. Aquellas formulaciones con menor contenido total tensioactivo/cotensioactivo y por lo tanto mayor contenido en fase externa (IPM), ceden mayores porcentajes de nifedipino durante la primera hora de ensayo.

A las 24 horas de ensayo, el porcentaje cedido de nifedipino desde las microemulsiones múltiples con variación en el contenido total Brij® 96/PG está

comprendido entre el 16,7 y 21,2%. Existen pocas diferencias en el porcentaje cedido desde los sistemas dispersos con un contenido Brij® 96/PG comprendido entre el 30 y 45%. Al realizar un análisis estadístico de varianza (ANOVA) no se observan diferencias estadísticamente significativas entre las microemulsiones múltiples con un 30% y 35% de contenido total Brij® 96/PG y entre los sistemas dispersos con un contenido total tensioactivo/cotensioactivo del 40 y 45%.

Al finalizar el ensayo los porcentajes cedidos de nifedipino desde los sistemas dispersos están comprendidos entre el 18,1 y el 12,3%. El análisis estadístico de varianza (ANOVA) muestra que existen diferencias estadísticamente significativas entre las microemulsiones múltiples con un 30 y 35% Brij® 96/PG y entre las microemulsiones múltiples con un 40 y 45% Brij® 96/PG.

El tiempo de latencia (t_l) de las microemulsiones múltiples (Tabla 60) disminuye en aquellos sistemas con un contenido menor en tensioactivo/cotensioactivo, ya que presentan el mayor porcentaje de fase externa y por lo tanto la mayor cantidad de nifedipino incorporado. La disminución de este parámetro se debe a un incremento en el gradiente de concentración desde la fase externa oleosa hacia el compartimento receptor, por la presencia de una mayor cantidad de principio activo en dicha fase.

<i>Microemulsión múltiple o/a/o</i>	<i>t_l</i>
30% Brij® 96/PG	0,014±0,007
35% Brij® 96/PG	0,051±0,004
40% Brij® 96/PG	0,063±0,005
45% Brij® 96/PG	0,103±0,004

Tabla 60. Tiempos de latencia de microemulsiones múltiples o/a/o cargadas de nifedipino en función del contenido total tensioactivo/cotensioactivo.

En la figura 113 se observa los perfiles de flujo del nifedipino desde microemulsiones múltiples con variaciones en el contenido total Brij® 96/PG durante 48 horas. Es importante destacar, que el flujo de nifedipino desde las microemulsiones múltiples, en función del contenido total tensioactivo/cotensioactivo, se caracteriza por un aumento significativo durante la primera hora de ensayo, alcanzándose valores comprendidos entre el 18,9 y 32,8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. Este fenómeno se debe a la rápida cesión del principio activo localizado en la fase externa de la microemulsión múltiple. Al inicio del ensayo son los sistemas dispersos con menor contenido Brij® 96/PG y, por lo tanto mayor contenido en fase externa, los que presentan valores de flujo elevados.

Posteriormente, en todas las microemulsiones múltiples se produce una disminución significativa del flujo, desde la una hasta las cuatro horas de ensayo, con valores comprendidos entre 7,7 y 9,9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. Esto se debe a una disminución del gradiente de concentración, que se origina desde la fase externa hacia el compartimento receptor, por la cesión del nifedipino.

Desde las 4 hasta las 6 horas de ensayo se observa un ligero aumento del flujo con valores comprendidos entre 8,7 y 11,9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. Entre las 6 y 8 horas se aprecia en todos los sistemas dispersos una etapa de meseta en la que el flujo se mantiene constante con valores medios de 11,7, 11,4, 9,6 y 8,7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ para las microemulsiones

múltiples con un 30, 35, 40 y 45% Brij® 96/PG, respectivamente se observa una. Este fenómeno se produce al mantenerse el gradiente de concentración constante, por difusión del principio activo desde la fase interna a la fase externa oleosa de los sistemas dispersos. A partir de las 8 horas hasta la finalización del ensayo, en todas las microemulsiones múltiples se produce una disminución progresiva y suave del flujo hasta valores comprendidos entre 5,3 y 8,4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, debido a un descenso en el gradiente de concentración que se origina desde la fase dispersa a la continua. El descenso en el gradiente de concentración está propiciado por una disminución del contenido total de nifedipino en todos los sistemas dispersos.

En todas las etapas anteriormente mencionadas, las formulaciones con menor contenido en tensioactivo/cotensioactivo son las que presentan mayores valores de flujo. Los flujos en el estado estacionario para las microemulsiones múltiples con un 30, 35, 40 y 45% en contenido total Brij® 96/PG son de 10,5, 9,5, 8,2 y 7,4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, respectivamente.

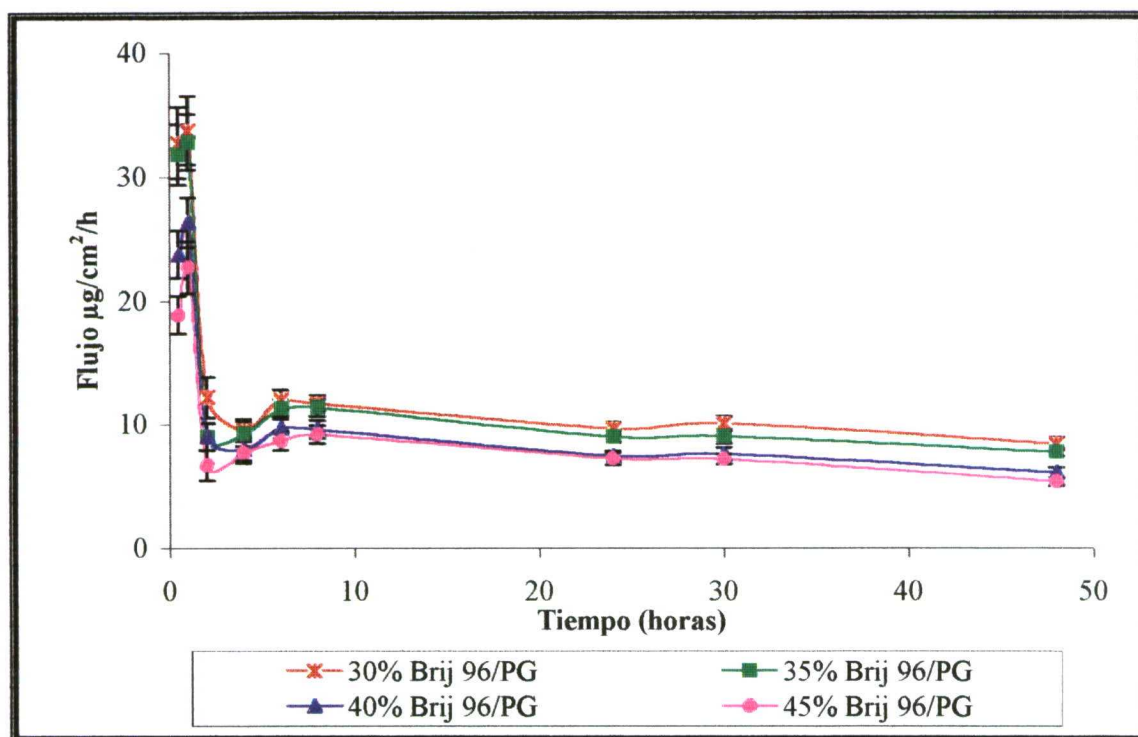


Figura 113. Flujos de nifedipino a través de la membrana PVDF desde microemulsiones múltiples o/a/o (microemulsión primaria (o/a)/Brij® 96/PG/IPM) cargadas con nifedipino en la fase interna ($18 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) y externa ($0,8 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) en función del contenido total Brij® 96/PG.

d) Influencia del contenido total de fase interna (microemulsión primaria o/a) sobre la cesión in vitro de nifedipino desde microemulsiones múltiples o/a/o.

La figura 114 muestra la cantidad cedida acumulada de nifedipino desde microemulsiones múltiples o/a/o con variación en el contenido de fase interna (microemulsión primaria o/a) en el intervalo comprendido entre el 5 y 20% en peso y un contenido total en Brij® 96/PG del 30% en peso a una relación fija 3:1 (p/p).



En todas las formulaciones se mantiene constante la concentración de nifedipino en la fase interna ($18 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) y externa ($0,8 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Sin embargo, las cantidades incorporadas en la fase interna y externa en cada una de las microemulsiones múltiples varía, ya que también lo hace el porcentaje de fase interna y externa presente en las mismas.

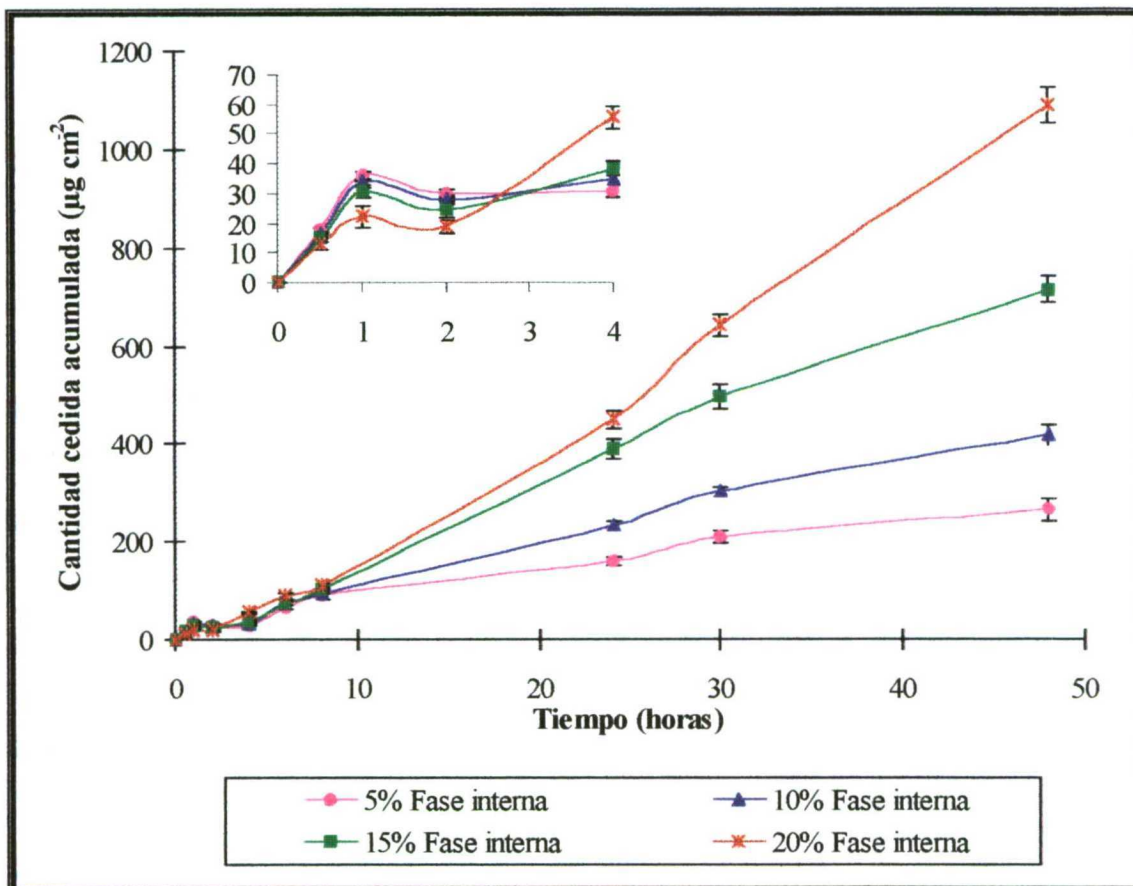


Figura 114. Perfiles de cesión *in vitro* de nifedipino desde microemulsiones múltiples o/a/o (microemulsión primaria o/a/Brij® 96/PG/IPM) cargadas de nifedipino en fase interna y externa con variaciones en el contenido de fase interna y un contenido constante Brij® 96/PG del 30% en peso a una relación fija 3:1 (p/p).

Como se observa, la variación en el contenido de fase interna en las microemulsiones múltiples influye en la cesión de nifedipino a través de la membrana artificial de PVDF. Durante las primeras 2 horas de ensayo, la cesión del principio activo aumenta en las formulaciones con menor contenido en fase interna. La explicación de este comportamiento reside en que estos sistemas dispersos presentan mayor contenido de fase externa oleosa y por lo tanto de nifedipino incorporado en las misma, favoreciéndose el gradiente de concentración desde la fase externa al compartimento receptor a través de la membrana.

Desde las 4 horas de ensayo hasta la finalización del mismo, las microemulsiones múltiples con mayor contenido en fase interna ceden mayor cantidad de nifedipino a través de la membrana artificial lipófila. Las diferencias en la cesión de nifedipino desde las distintas formulaciones se hacen más significativas a medida que

transcurre el ensayo. Este efecto se aprecia con mayor claridad en los sistemas dispersos con un 20% de fase interna.

Por lo tanto, las diferencias observadas en la cesión de nifedipino desde las microemulsiones múltiples o/a/o pueden ser debidas al gradiente de concentración generado entre la fase interna y la fase externa oleosa. El gradiente de concentración desempeña una función vital en la cesión de nifedipino si se consideran las diferencias significativas en la cantidad de principio activo localizado en la fase interna a medida que aumenta su porcentaje en los sistemas dispersos. Las perfiles de cesión del principio activo que se obtienen desde las microemulsiones múltiples o/a/o se ajustan a una cinética de orden cero.

En la tabla 61 se muestran los coeficientes de permeabilidad (K_p) de nifedipino desde las microemulsiones múltiples con variación en el contenido de fase interna (microemulsión primaria o/a).

<i>Microemulsión múltiple o/a/o</i>	<i>$K_p \cdot 10^3 (cm \cdot h^{-1})$</i>
<i>5% Fase interna</i>	<i>6,23±0,051</i>
<i>10% Fase interna</i>	<i>4,93±0,039</i>
<i>15% Fase interna</i>	<i>4,41±0,027</i>
<i>20% Fase interna</i>	<i>3,89±0,019</i>

Tabla 61. Coeficientes de permeabilidad (K_p) de las microemulsiones múltiples o/a/o (microemulsión primaria (o/a)/Brij® 96/PG/IPM) cargadas de nifedipino en función del contenido de fase interna (microemulsión primaria o/a).

Los K_p se calculan a partir del flujo obtenido en el estado estacionario en función de la concentración total de nifedipino presente en cada uno de los sistemas dispersos. Los mayores coeficientes de permeabilidad corresponden a aquellos sistemas dispersos con menor contenido en fase interna y por lo tanto, mayor contenido en fase continua.

Los coeficientes de permeabilidad de nifedipino a través de la membrana artificial lipófila son bastantes lineales en relación a los coeficientes de reparto de nifedipino, obtenidos en sistemas IPM/agua en presencia de propilenglicol según los porcentajes IPM, tensioactivo/cotensioactivo y agua presente en las formulaciones (Figura 115). De esta manera, los coeficientes de reparto del nifedipino entre la fase oleosa y la fase acuosa en presencia de distintas cantidades de propilenglicol pueden ser utilizados como una aproximación para evaluar la partición del fármaco dentro de la microemulsión múltiple. A medida que aumenta el contenido en fase interna disminuye el coeficiente de permeabilidad de nifedipino desde las distintas microemulsiones múltiples

Este comportamiento puede ser debido a dos causas: 1) dilución de la concentración de PG presente en las formulaciones al aumentar el porcentaje de fase interna, cuyo componente mayoritario es agua, disminuyendo, por tanto, la partición del fármaco desde la fase interna oleosa a la fase acuosa de la microemulsión o/a, 2) disminución de la partición de nifedipino desde la fase acuosa a la fase externa oleosa

en las microemulsiones múltiples o/a/o con mayor contenido de fase interna por la presencia de menor porcentaje de fase continua.

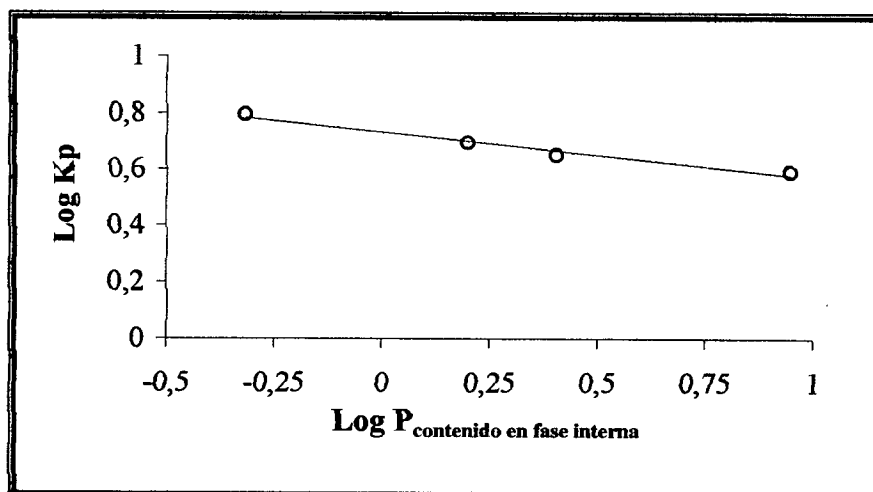


Figura 115. Logaritmos de los coeficientes de permeabilidad de nifedipino a través de la membrana artificial lipófila desde microemulsiones múltiples con variaciones en el contenido de fase interna (microemulsión primaria o/a) frente a los logaritmos de sus respectivos coeficientes de reparto.

En los sistemas dispersos estudiados no existe una relación directa entre las cantidades cedidas y los K_p obtenidos. Por lo tanto, la mayor cesión de principio activo desde sistemas dispersos con coeficientes de permeabilidad bajos se debe a un incremento en el gradiente de concentración entre la fase interna y la fase externa, al aumentar considerablemente la concentración de fármaco mediante la incorporación de un mayor contenido en fase dispersa.

Los porcentajes cedidos de nifedipino a distintos tiempos desde las microemulsiones múltiples con variación en el contenido de fase interna (microemulsión primaria o/a) se muestran en la tabla 62.

Microemulsión múltiple o/a/o	Cantidad cedida (% Dosis)		
	1 h	24 h	48 h
5% Fase interna	5,32±0,33	23,61±0,92	39,45±1,79
10% Fase interna	3,09±0,27	24,23±0,91	42,18±2,11
15% Fase interna	2,00±0,18	25,76±1,12	47,26±2,07
20% Fase interna	1,15±0,16	26,29±1,34	59,44±1,98

Tabla 62. Porcentaje cedido de nifedipino desde microemulsiones múltiples o/a/o a distintos tiempos en función del contenido en fase interna (microemulsión primaria o/a).

Durante la primera hora de ensayo son las microemulsiones múltiples o/a/o con mayor porcentaje de fase externa las que ceden un mayor porcentaje de principio activo. Los porcentajes cedidos de nifedipino desde cada uno de los sistemas dispersos están comprendidos entre 1,2 y 5,3%. Al realizar un ANOVA se observan diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes cedidos desde las microemulsiones múltiples objeto de estudio.

A las 24 horas de ensayo el porcentaje cedido de nifedipino desde las microemulsiones múltiples, con variación en el contenido de fase interna, está comprendido entre el 23,6 y 26,3%. El porcentaje cedido desde los distintos sistemas dispersos es muy similar entre sí. Al realizar un análisis estadístico de varianza (ANOVA) se observan diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes cedidos desde las microemulsiones múltiples con un 5 y 20% de fase interna.

A las 48 horas de ensayo, el porcentaje cedido de nifedipino desde las microemulsiones múltiples, con variación en el contenido en fase interna, está comprendido entre el 39,5 y 59,4%. Como se puede apreciar, los sistemas dispersos con mayor contenido en fase dispersa ceden los mayores porcentajes de nifedipino. Al realizar un ANOVA no se observan que existen diferencias estadísticamente significativas entre las microemulsiones múltiples con un 5 y un 10% de fase interna y las microemulsiones múltiples con un 10 y 15% de fase interna.

El tiempo de latencia (t_l) depende de la cantidad de nifedipino incorporada en la fase externa (Tabla 63). Así, a medida que disminuye el porcentaje de fase interna incorporado en las microemulsiones múltiples, aumenta el porcentaje de fase externa y por lo tanto la cantidad de nifedipino incorporado en la misma dando lugar a una disminución del tiempo de latencia.

<i>Microemulsión múltiple o/a/o</i>	<i>t_l</i>
5% Fase interna	0,018±0,011
10% Fase interna	0,015±0,011
15% Fase interna	0,005±0,002
20% Fase interna	0,093±0,002

Tabla 63. Tiempos de latencia de microemulsiones múltiples o/a/o de nifedipino en función del contenido de fase interna (microemulsión primaria o/a).

En la figura 116 se observan los perfiles de flujo del nifedipino desde microemulsiones múltiples con variación en el contenido en fase interna durante 48 horas. Como se puede observar, los perfiles de flujo del nifedipino obtenidos en función del tiempo, obtenidos desde cada una de las microemulsiones múltiples o/a/o, se caracterizan por un incremento de este parámetro durante la primera hora de ensayo. Este efecto es más significativo en los sistemas con menor contenido en fase interna, ya que en ellos se encuentra favorecido el gradiente de concentración debido a una mayor presencia de principio activo en la fase externa. Los valores de flujo de las microemulsiones múltiples o/a/o se encuentran comprendidos entre 22,2 y 35,9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$.

A partir de la hora hasta las 4 horas de ensayo se observa una disminución del flujo en todas las microemulsiones múltiples con valores comprendidos entre 7,6 y 13,9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. Las microemulsiones múltiples con menor contenido en fase interna presentan a las 4 horas de ensayo los menores valores de flujo.

Es interesante destacar el comportamiento de los perfiles de flujo a partir de las 4 horas de ensayo. Todas las microemulsiones múltiples o/a/o objeto de estudio experimentan un aumento del flujo hasta las 6 horas de ensayo con valores

comprendidos entre 10,8 y 14,8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, siendo los sistemas dispersos con mayor contenido en fase interna los que presentan los valores más altos. A partir de las 6 horas, los flujos de nifedipino se mantienen prácticamente constantes hasta las 8 horas de ensayo.

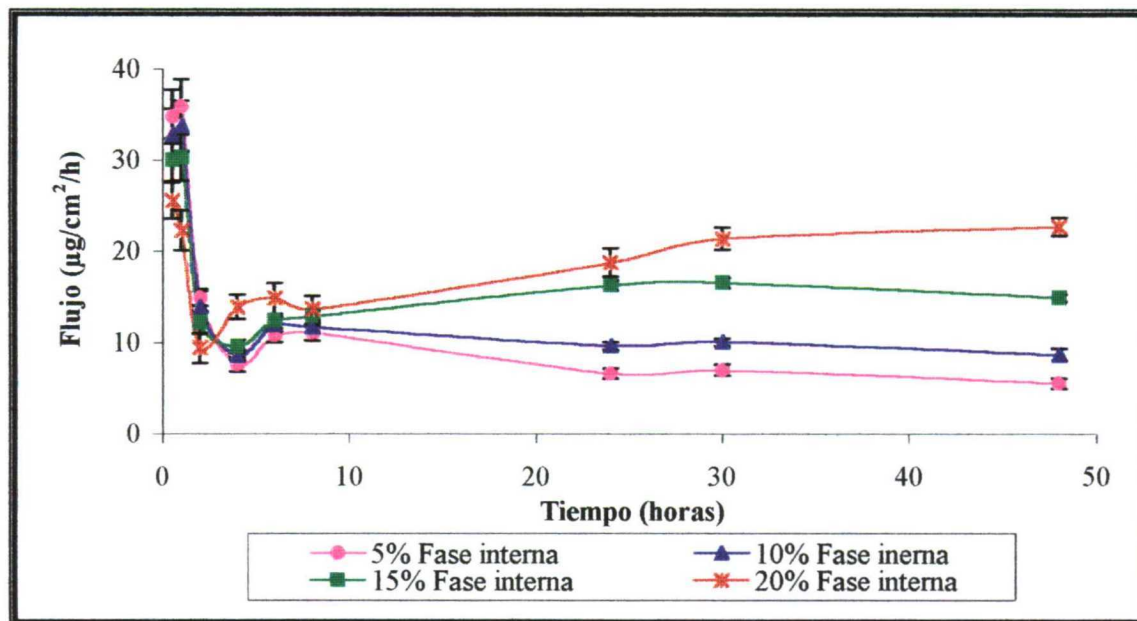


Figura 116. Flujos de nifedipino a través de la membrana PVDF desde microemulsiones múltiples o/a/o de nifedipino (microemulsión primaria (o/a)/Brij® 96/PG/IPM) en función del contenido de fase interna (microemulsión o/a).

En las microemulsiones múltiples o/a/o con un 5 y 10% de fase interna, desde las 6 hasta las 48 horas de ensayo, se produce una disminución progresiva del flujo con valores de 5,5 y 8,7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, respectivamente.

Sin embargo, en las microemulsiones múltiples con un 15% de fase interna se observa un aumento del flujo hasta alcanzar un valor de 16,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ a las 30 horas de ensayo. A continuación se produce una disminución del flujo con un valor de 14,9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ a las 48 horas de ensayo. En las microemulsiones múltiples con un 20% de fase interna se observa un comportamiento similar, incrementando el flujo progresivamente hasta la finalización del ensayo (22,7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$).

Los flujos en el estado estacionario de las microemulsiones múltiples con un 5, 10, 15 y 20% de fase interna son 9,1, 10,6, 13,5 y 16,3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, respectivamente.

6.2.4.- Estudios comparativos de cesión *in vitro* de nifedipino desde sistemas dispersos o/a/o, o/a y a/o constituidos por Brij® 96/PG como tensioactivo/cotensioactivo.

El objetivo de este estudio es evaluar la absorción de nifedipino a través de la membrana de PVDF, empleada como modelo de piel, desde sistemas dispersos o/a/o, o/a y a/o y las ventajas que ofrecen las microemulsiones múltiples o/a/o respecto a las microemulsiones a/o y o/a.

- Método:

Para poder hacer un estudio comparativo de los perfiles de cesión de nifedipino obtenidos desde los sistemas dispersos o/a/o, a/o y o/a, se deben desarrollar formulaciones con la misma composición cuantitativa de fase interna (microemulsión primaria o/a, IPM y agua) tensioactivo/cotensioactivo (Brij® 96/PG) y fase externa (IPM y agua). La composición cualitativa de los sistemas dispersos tampoco varía.

Debido a que no es posible el desarrollo galénico de microemulsiones o/a y a/o con la misma composición cuantitativa que la microemulsión múltiple o/a/o seleccionada (fase interna/Brij® 96/PEG 400/IPM; 20/30/50; p/p/p), se emplean sistemas dispersos constituidos por un 10% fase interna, 35% tensioactivo/cotensioactivo y 55% fase externa.

Las microemulsiones o/a están constituidas por un 10% IPM (fase interna), 35% Brij® 96/PG (tensioactivo/cotensioactivo) y 55% agua (fase externa). El desarrollo de este tipo de microemulsiones se ha descrito ampliamente en el apartado 5.1.6.

Las microemulsiones a/o están constituidas por un 10% agua, 35% Brij® 96/PG y 55% de IPM. El desarrollo de este tipo de microemulsiones se realiza utilizando el mismo método que el empleado para las microemulsiones o/a.

La concentración total de principio activo presente en la microemulsión múltiple o/a/o y microemulsión o/a es $2,21 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ mientras que, en la microemulsión a/o es $1,6 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (máxima cantidad de principio activo capaz de solubilizarse en la fase oleosa).

El nifedipino, debido a su carácter lipófilo, se incorpora en la fase interna (IPM) de la microemulsión o/a y en la fase externa (IPM) de la microemulsión a/o. En la múltiple microemulsión o/a/o la cantidad de principio activo incorporado en la fase interna oleosa es $18 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ y en la fase externa oleosa $0,8 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Las condiciones experimentales y el tratamiento de los datos se han descrito ampliamente en el apartado 6.1.3. del presente capítulo.

- Resultados y comentarios:

En la figura 117 se comparan los perfiles de cesión del nifedipino a través de la membrana de PVDF desde la microemulsión múltiple o/a/o y las microemulsiones o/a y a/o. Como se observa, la incorporación de nifedipino en los sistemas dispersos estudiados da lugar a diferencias en los perfiles de cesión del fármaco a través de la membrana artificial lipófila. Durante las primeras cuatro horas de ensayo, la mayor cesión de nifedipino, en cuanto a magnitud y extensión, se produce desde la microemulsión a/o. Este fenómeno se debe a la mayor concentración de nifedipino presente en la fase externa ($1,6 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) respecto a las microemulsiones múltiples ($0,8 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) y la microemulsión o/a. La cesión de nifedipino desde la fase externa de la microemulsión a/o es muy rápida durante las 4 horas de ensayo y no está regulada por la presencia de principio activo en la fase interna. Posteriormente, se produce un

aumento progresivo de la cesión a través de la membrana artificial hasta alcanzar una etapa de meseta a las 30 horas de ensayo.

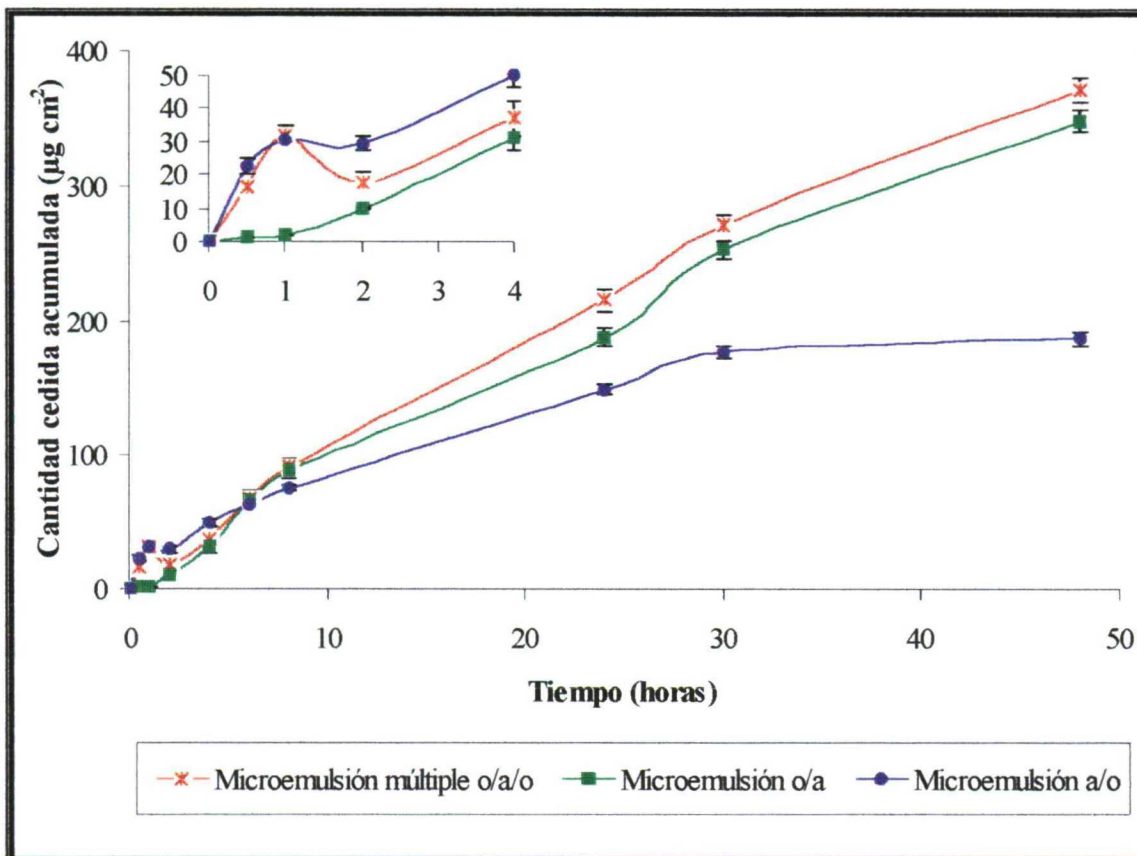


Figura 117. Perfiles de cesión de nifedipino desde sistemas dispersos (10% fase interna/35% Brij® 96/PG/55% fase externa) o/a/o, o/a y a/o a través de la membrana de PVDF.

En la microemulsión o/a/o, la incorporación de nifedipino en la fase externa favorece, inicialmente, la cesión del principio activo durante la primera hora de ensayo. sin embargo, a las 2 horas de ensayo se produce un descenso en la cantidad cedida de nifedipino ya que la concentración de principio activo en la fase externa disminuye, hasta que el nifedipino incorporado en la fase interna difunda hacia la fase externa.

A partir de las 4 horas hasta la finalización del ensayo, se produce un aumento progresivo de la cesión de nifedipino desde la microemulsión múltiple o/a/o. A partir de las 6 horas de ensayo, la mayor cesión de nifedipino se produce desde la microemulsión múltiple o/a/o. La fase externa oleosa (IPM) presente en la microemulsión múltiple o/a/o favorece, inicialmente, la cesión de nifedipino desde la fase externa en la que se encuentra incorporado y posteriormente, su partición desde la fase interna a la fase continua. El resultado final es una mayor cesión de nifedipino desde las 6 hasta las 48 horas de ensayo en comparación con las microemulsiones a/o y o/a.

En la microemulsión o/a se produce una menor cesión de nifedipino durante las primeras 4 horas de ensayo en comparación con los sistemas dispersos o/a/o y a/o. Este comportamiento se debe a que el principio activo tiene que difundir desde la fase dispersa a la fase continua para absorberse, posteriormente, a través de la membrana. Únicamente, el nifedipino presente en la fase continua es capaz de atravesar la

membrana de PVDF. En este tipo de microemulsiones, la absorción está inicialmente gobernada por la pequeña concentración de nifedipino presente en la fase externa (agua). A continuación, una vez que el nifedipino alcanza la fase externa, la absorción a través de la membrana aumenta debido al gradiente de concentración que se produce entre la fase oleosa y acuosa.

En función de lo comentado anteriormente, se puede concluir que la microemulsión múltiple o/a/o y la microemulsión o/a ejercen un efecto reservorio debido a la incorporación del principio activo en la fase interna, originándose en ambos casos un gradiente de concentración positivo desde la fase interna a la fase externa. Como consecuencia de este efecto reservorio, los perfiles de absorción de los sistemas dispersos o/a/o y o/a se ajustan a cinéticas de orden cero, en comparación a la cinética de orden uno observada en la microemulsión a/o.

En la tabla 64 se muestran los porcentajes cedidos de nifedipino a distintos tiempos desde los sistemas dispersos o/a/o, o/a y a/o.

Microemulsión	Cantidad cedida(% Dosis)		
	1 h	24 h	48 h
<i>o/a/o</i>	2,96±0,27	20,01±0,81	34,55±1,78
<i>o/a</i>	0,18±0,03	17,49±0,61	28,22±1,03
<i>a/o</i>	7,19±0,36	34,88±1,89	43,78±1,17

Tabla 64. Porcentaje cedido de nifedipino desde sistemas dispersos o/a/o, o/a y a/o a distintos tiempos.

Durante la primera hora de ensayo el porcentaje cedido de nifedipino desde los sistemas dispersos o/a/o y a/o es 16,4 y 39,9 veces superior, respectivamente, respecto a la microemulsión a/o.

A las 24 horas de ensayo el mayor porcentaje cedido de nifedipino corresponde a la microemulsión a/o. Sin embargo, los porcentajes cedidos de nifedipino desde los sistemas dispersos con igual concentración de principio activo (microemulsión o/a y microemulsión múltiple o/a/o) son muy similares. Al realizar un ANOVA no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los sistemas dispersos o/a/o y a/o.

A las 48 horas de ensayo, el mayor porcentaje de nifedipino cedido corresponde al sistema disperso a/o. Los porcentajes cedidos desde los sistemas dispersos o/a/o y o/a con igual concentración de principio activo son del 34,5 y 28,2%, respectivamente. Al realizar un ANOVA se observan diferencias estadísticamente significativas entre los sistemas dispersos o/a/o y a/o.

Por lo tanto, el sistema disperso que cede un mayor porcentaje de nifedipino durante todo el ensayo corresponde a la microemulsión a/o. No obstante, hay que tener en cuenta que existen diferencias significativas en la concentración de nifedipino presente en la microemulsión a/o (1,6 mg·ml⁻¹) con respecto a la de los sistemas dispersos o/a/o y o/a (2,24 mg·ml⁻¹). Además, la cesión en la microemulsión a/o se ve favorecida por no existir un efecto reservorio ya que el principio activo se encuentra localizado en la fase externa oleosa.

La tabla 65 muestra los coeficientes de permeabilidad (K_p) y los tiempos de latencia de nifedipino desde la microemulsión múltiple o/a/o y las microemulsiones o/a y a/o.

Microemulsión	$K_p \cdot 10^3$ ($\text{cm} \cdot \text{h}^{-1}$)	t_l (horas)
o/a/o	$4,30 \pm 0,029$	$0,051 \pm 0,004$
o/a	$3,98 \pm 0,016$	$0,662 \pm 0,012$
a/o	$17,8 \pm 0,098$	$0,021 \pm 0,002$

Tabla 65. Coeficientes de permeabilidad (K_p) y tiempos de latencia (t_l) de nifedipino desde los sistemas dispersos o/a/o, o/a y a/o (10% fase interna, 30% /Brij® 96/PG y 55% fase externa) a través de la membrana de PVDF.

La permeabilidad máxima de nifedipino se observa con la microemulsión a/o, ya que no existe efecto reservorio que regule la cantidad cedida de principio activo. Sin embargo, en los sistemas dispersos con efecto reservorio, con igual concentración de principio activo, la permeabilidad de nifedipino en la microemulsión múltiple o/a/o es mayor que en la microemulsión o/a. Este fenómeno puede explicarse por la fuerza conductora que ejerce la fase externa oleosa, presente en el sistema disperso o/a/o, sobre la partición del principio activo localizado en la fase interna.

Los sistemas dispersos o/a/o y a/o que permiten la incorporación de nifedipino en la fase externa oleosa presentan tiempos de latencia inferiores. Por el contrario, en la microemulsión o/a se obtiene un valor mayor de t_l porque el nifedipino tiene que difundir desde la fase interna a la externa durante la primera hora de ensayo (Tabla 65).

Los perfiles de flujo de la microemulsión múltiple o/a/o y las microemulsiones o/a y a/o se muestran en la figura 118

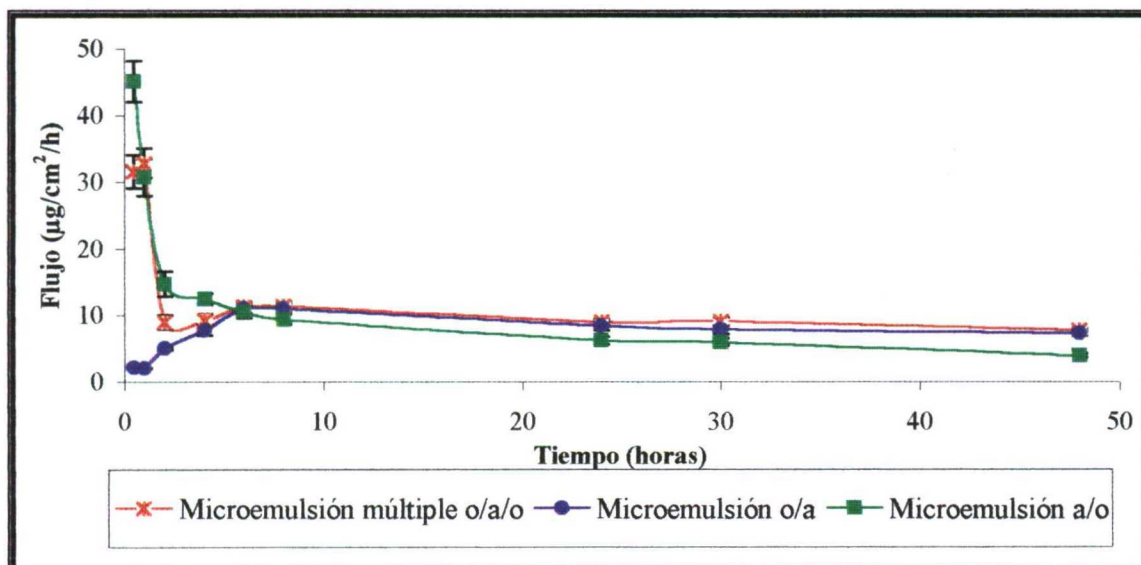


Figura 118. Flujos de nifedipino a través de la membrana PVDF desde los sistemas dispersos o/a/o, o/a y o/a constituidos por 10% fase interna, 35% Brij® 96/PG y 55% IPM.

La posibilidad de incorporar nifedipino en la fase externa de la microemulsión múltiple o/a/o y microemulsión a/o incrementa significativamente los valores de flujo durante la primera hora de ensayo, en comparación con la microemulsión o/a.

Así, en los sistemas dispersos o/a/o y a/o se caracterizan por un incremento considerable del flujo con valores aproximados de $31 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ durante la primera hora de ensayo. Posteriormente, se produce de una disminución drástica del flujo con valores de 8,9 y $14,7 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ para la microemulsión múltiple y la microemulsión a/o, respectivamente, a las 2 horas de ensayo.

En la microemulsión múltiple se observa un aumento del flujo desde las 2 hasta las 6 horas de ensayo ($11,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$), manteniéndose este flujo hasta las 8 horas de ensayo. A partir de este tiempo, se produce una disminución progresiva del flujo hasta las 48 horas de ensayo con un valor de $7,7 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$.

La microemulsión a/o se caracteriza por una disminución del flujo desde las 2 hasta las 48 horas de ensayo. El valor del flujo al final del ensayo es de $3,89 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$.

Los valores de flujo en el estado estacionario obtenidos en los sistemas dispersos o/a/o y a/o son 9,5 y $7,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, respectivamente.

El perfil de flujo de la microemulsión o/a se caracteriza por valores muy pequeños del flujo de nifedipino durante la primera hora de ensayo (aproximadamente $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$). Una vez que el nifedipino difunde desde la fase interna a la externa para absorberse a través de la membrana de PVDF, los valores de flujo incrementan progresivamente hasta las 4 horas de ensayo con valores de $11,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. El flujo se mantiene prácticamente constante hasta las 8 horas de ensayo. Posteriormente y hasta la finalización del estudio de cesión se produce una ligera disminución de este parámetro ($7,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$). El flujo en el estado estacionario es $8,9 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$.

Se puede concluir que, los mayores valores más altos de flujo de nifedipino obtenidos desde la microemulsión múltiple o/a/o con respecto a la microemulsión o/a pueden atribuirse: 1) a la incorporación de nifedipino en la fase externa oleosa favoreciendo su cesión durante las dos primeras horas de ensayo y 2) a la fuerza de conducción que ejerce, posteriormente, la fase externa oleosa sobre nifedipino, favoreciendo su partición desde la fase interna hacia la fase continua.

6.3.- Estudios de cesión in vitro de nifedipino a través de piel de rata desde microemulsiones múltiples o/a/o constituidas por microemulsión primaria o/a, Brij® 96, PEG 400 y IPM

El estudio de cesión de nifedipino desde la microemulsión múltiple o/a/o seleccionada (microemulsión primaria o/a/ Brij® 96/PEG 400/IPM; 20/30/50; p/p/p, con una relación fija Brij® 96/PEG 400 de 3:1), empleando un modelo animal nos ayuda a predecir si la absorción de nifedipino a través de piel humana es adecuada para obtener niveles terapéuticos en sangre.

Además, este estudio permite determinar, en función de la cantidad de nifedipino incorporada en la fase externa, el uso potencial de la microemulsión múltiple o/a/o como vehículo para la administración transdérmica de nifedipino

En nuestros estudios de cesión se utiliza la rata como modelo de animal. Este modelo es empleado en la mayoría de los estudios de cesión in vitro realizados por distintos autores con una gran variedad de fármacos (Miyazaki y cols, 1994; Mac Daid y cols, 1996; Vora y cols, 1998). Por otra parte, se determinan una serie de parámetros (coeficiente de permeabilidad, flujo, cantidad cedida, etc.) con el fin de explicar y evaluar la absorción del nifedipino a través de piel de rata.

6.3.1.- Preparación de las microemulsiones

En este apartado se desarrollan distintas microemulsiones múltiples o/a/o constituidas por un 20% microemulsión primaria o/a, 30% Brij® 96/PEG 400 y 50% IPM a una relación fija Brij® 96/PEG 400 de 3:1, con variaciones en la cantidad de principio activo incorporada en la fase externa. También, se prepara una formulación control con la misma composición cuantitativa y cualitativa sin nifedipino incorporado en la fase externa

- Método:

El desarrollo galénico de las microemulsiones múltiples o/a/o formuladas en esta sección, así como la incorporación del principio activo en la fase interna y externa, se describe detalladamente en el *apartado 5.3* de la presente memoria. El superíndice “*”, utilizado en la notación de todas las microemulsiones múltiples, indica la presencia de nifedipino en la fase interna, externa o en ambas.

Para evaluar el efecto de la incorporación de nifedipino en la fase externa (IPM) sobre el perfil de cesión de la múltiple microemulsión o/a/o (microemulsión primaria o/a/ Brij® 96/PEG 400/IPM; 20/30/50, p/p/p a una relación fija tensioactivo/cotensioactivo 3:1 (p/p)) se procede a la incorporación de las siguientes cantidades de principio activo: 0, 4 y 8 mg de nifedipino que corresponden, respectivamente, a las concentraciones de 0, 0,8 y 1,6 mg·ml⁻¹. La concentración de nifedipino presente en la fase interna se mantiene constante a 18 mg·ml⁻¹.

Como formulación control se desarrolla la misma microemulsión múltiple con la máxima concentración de nifedipino presente en la fase externa (1,6 mg·ml⁻¹).

6.3.2.- Estudios de cesión in vitro

- Método:

Los estudios de absorción in vitro a través de piel de rata se realizan con las microemulsiones múltiples o/a/o desarrolladas en el *apartado 6.3.1.*, variando la cantidad de nifedipino incorporada en la fase externa.

- *Obtención y preparación de piel de rata*: se utilizan ratas hembra de la raza Sprague-Dawley con un peso comprendido entre 200-300 g. Las ratas son anestesiadas mediante una inyección intraperitoneal de fenobarbital (40 mg·kg⁻¹). Se afeita La zona

abdominal mediante la utilización de tijeras y una maquinilla eléctrica. Posteriormente, se aplica crema depilatoria en la zona afeitada durante 5 minutos y entonces, se limpia con la ayuda de una espátula de plástico y algodón.

Después, la piel abdominal se obtiene quirúrgicamente por incisión en un costado del animal, separando del tejido conectivo localizado debajo de la misma con la ayuda de un escalpelo. El animal se sacrifica inmediatamente con una inyección de fenobarbital. La grasa adherida a la piel se elimina cuidadosamente con unas tijeras.

La dermis de la piel se pone en contacto con solución salina (0,1M NaCl) durante 30 minutos antes de empezar el ensayo con el fin de eliminar restos de tejidos, sangre y enzimas. La piel se utiliza, inmediatamente, después en los ensayos de cesión mantener su integridad.

- Celda de difusión: los estudios de cesión de nifedipino desde las microemulsiones múltiples o/a/o objeto de estudio, se realizan en una celda de difusión de Franz constituida por un compartimento donador y un compartimento receptor con un área total disponible para la difusión de $2,06 \text{ cm}^2$. El compartimento receptor se llena con 12,5 ml de una mezcla de tampón fosfato (0,2 M, pH=6,0)/propilenglicol (70/30; v/v), a pH 7,4, para mantener condiciones sink (Ruan y cols, 1992; Megrab y cols, 1995). La piel se sitúa entre el compartimento donador y receptor, unidos mediante un dispositivo de sujeción, con el estrato córneo hacia el compartimento donador y la dermis hacia el compartimento receptor.

El compartimento receptor se agita a 300 r.p.m y se encuentra termostatzado a 37°C durante todo el experimento mediante el paso continuo de agua a través de una doble camisa localizada en este compartimento. El compartimento donador se sella con parafilm para evitar posibles fenómenos de evaporación e imitar, de esta manera, las condiciones in vivo. Antes de iniciar el experimento todo el sistema se mantiene en equilibrio durante 30 minutos.

- Muestreo y valoración del nifedipino: se toman 0,75 ml de muestra del compartimento receptor a la 1, 2, 4, 6, 8, 24, 30 y 48 horas y se reemplaza con el mismo volumen de fluido receptor (tampón fosfato (0,2 M, pH=6,0)/propilenglicol (70/30; v/v)). La cesión de nifedipino desde las formulaciones objeto de estudio a través de la membrana biológica se evalúa durante 48 horas. La concentración del fármaco presente en las muestras se determina por espectrofotometría UV/Visible a una $\lambda = 237,5$ utilizando como blanco el medio receptor. Todo el sistema así como, las muestras tomadas a cada intervalo de tiempo se protegen de la luz durante el tiempo que dura el ensayo con el fin de evitar la degradación del principio activo. Los ensayos se realizan por cuadruplicado ($n=4$).

- Tratamiento de datos: el tratamiento y análisis estadístico de los datos obtenidos en los estudios de cesión in vitro se ha descrito detalladamente en el apartado 6.1.3.

El tiempo de latencia (t_l) se determina por extrapolación al eje x de la porción lineal de los perfiles de cesión, obtenidos al representar la cantidad de nifedipino que se absorbe por unidad de superficie frente al tiempo.

- Resultados y comentarios:

La cesión de nifedipino desde las microemulsiones múltiples o/a/o (microemulsión primaria o/a/ Brij® 96/PEG 400/IPM; 20/30/50; p/p/p, con una relación fija Brij® 96/PEG 400 de 3:1) se encuentra regulada principalmente por la transferencia del fármaco desde la fase dispersa a la fase continua y por la difusión del fármaco a través de la piel desde la fase continua al medio receptor (condiciones sink).

La difusión de nifedipino desde la fase interna a la externa en las microemulsiones múltiples o/a/o se encuentra influenciada por tres posibles mecanismos:

-1) La formación “in situ” de micelas inversas en las fases oleosas que constituyen el sistema disperso. La validez de este mecanismo depende de la naturaleza del tensioactivo que forma la micela. Se ha demostrado que las micelas inversas se forman en la fase oleosa de sistemas dispersos estabilizados por tensioactivos monoméricos, como es el caso del Brij® 96 (Sela Y. y cols., 1995). En este caso, el transporte de nifedipino a través de micelas inversas sería uno de los posibles mecanismos que facilitaría la migración del fármaco desde la fase interna oleosa a la fase externa oleosa.

- 2) La presencia de cotensioactivos (propilenglicol y PEG 400) desempeñan un papel importante en la cesión del nifedipino desde la microemulsión múltiple o/a/o. Estos solventes facilitan la partición del principio activo desde las distintas fases que constituyen el sistema disperso debido a la alta solubilidad del nifedipino en los mismos.

- 3) La fuerza conductora que ejerce la fase externa oleosa (IPM) sobre el nifedipino (molécula de marcado carácter lipófilo), localizado en la fase interna oleosa, facilita la partición del principio activo desde la fase oleosa a la acuosa de la microemulsión primaria y posteriormente, hacia la fase dispersa de la microemulsión múltiple o/a/o.

La figura 119 representa la cantidad cedida acumulada de nifedipino en función del tiempo a través de piel de rata desde diferentes microemulsiones múltiples o/a/o constituidas por microemulsión primaria (o/a)/Brij® 96/PEG 400/IPM; 20/30/50 (p/p/p) a una relación fija Brij® 96/PEG 400 de 3:1. En todas las formulaciones la cantidad de principio activo incorporado en la fase interna se mantiene constante ya que el porcentaje de fase interna presente en las microemulsiones múltiples es el mismo (20 % de fase interna con una concentración de nifedipino de 18 mg·ml⁻¹), mientras que se varía la concentración de nifedipino incorporado en la fase externa.

Se estudia la incorporación de distintas concentraciones de nifedipino, en la fase continua de la microemulsión múltiple o/a/o, con el fin de evaluar el efecto que ejerce el aumento de dicha concentración sobre los perfiles de cesión del principio activo desde la formulación seleccionada a través de piel de rata.

La incorporación de nifedipino en la fase continua (0,8 y 1,6 mg·ml⁻¹ de nifedipino) de las microemulsiones múltiples o*/a/o* favorece la cesión de nifedipino a

través de la membrana biológica (piel de rata) durante las cuatro primeras horas de ensayo. Comparando con el perfil de cesión de nifedipino desde la microemulsión múltiple o*/a/o, la cantidad cedida de nifedipino desde los sistemas dispersos con 0,8 y 1,6 mg·ml⁻¹ de principio activo en la fase continua es del orden de 4,6 y 6,5 veces superior a la hora de ensayo, 4,1 y 5,2 veces superior a las 2 horas de ensayo y de 1,6 y 1,4 veces superior a las 4 horas de ensayo, respectivamente. En las microemulsiones múltiples o*/a/o* este hecho se debe a la rápida difusividad del principio activo desde la fase externa al compartimento receptor a través de la membrana. Por el contrario, en la microemulsión múltiple o*/a/o, el nifedipino tiene que difundir, durante la primera hora de ensayo, desde la fase interna a la externa.

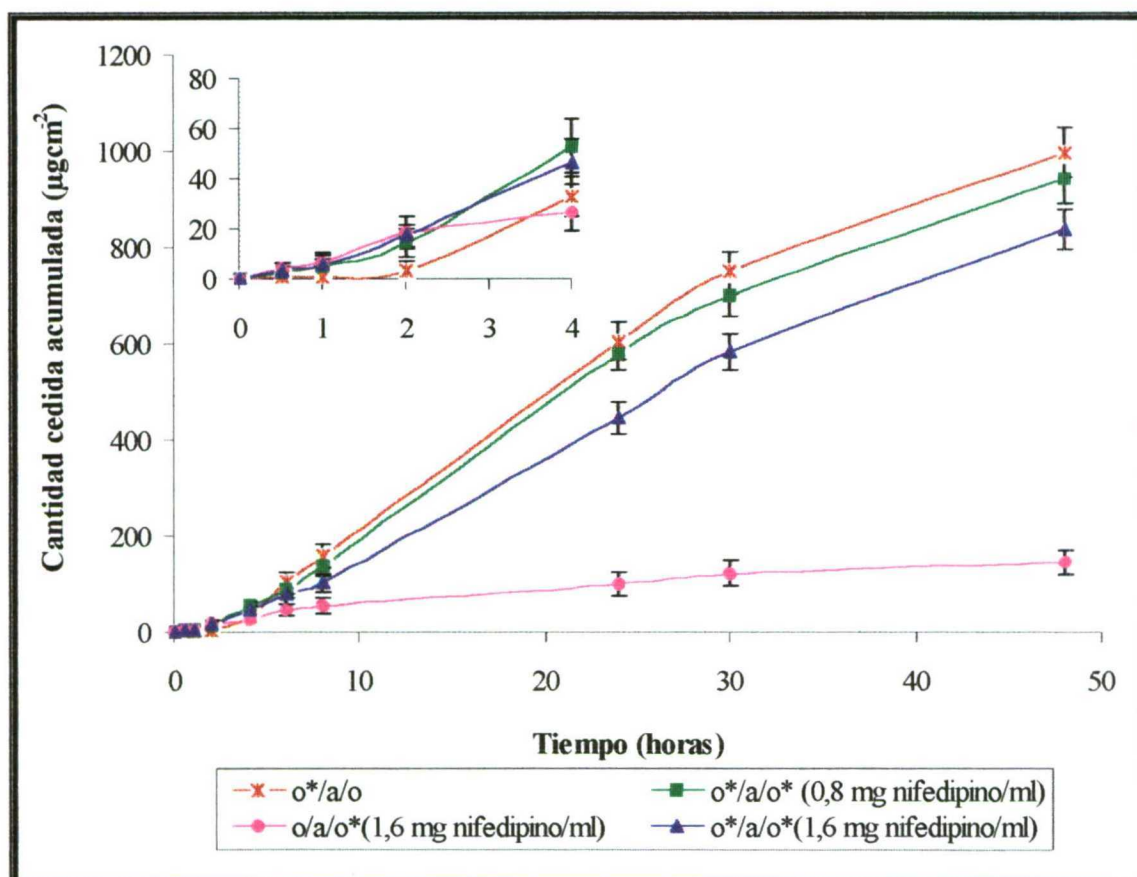


Figura 119. Perfiles de cesión *in vitro* de nifedipino desde microemulsiones múltiples o/a/o (microemulsión primaria (o/a)/Brij® 96/PEG 400/IPM; 20/30/50, p/p/p) a través de piel de rata con 36 mg de nifedipino incorporado en la fase interna y distintas concentraciones de nifedipino en fase externa (0, 0,8 y 1,6 mg·ml⁻¹) y una formulación control (microemulsión primaria o/a/Brij® 96/PEG 400/IPM; 20/30/50, p/p/p) con 1,6 mg·ml⁻¹ de nifedipino en la fase externa.

A partir de las 4 horas de ensayo hasta la finalización del mismo existe un aumento de la cesión de nifedipino, en cuanto a velocidad y magnitud, desde microemulsiones múltiples o*/a/o respecto a los sistemas o*/a/o*. A las 24 horas, las cantidades cedidas acumuladas de nifedipino desde las microemulsiones múltiples o*/a/o, o*/a/o* (0,8 mg de nifedipino/ml) y o*/a/o* (1,6 mg de nifedipino/ml) son 605,9, 579,7 y 445,6 µg·cm⁻², respectivamente. Mientras que, a las 48 horas de ensayo las cantidades cedidas de nifedipino desde las microemulsiones múltiples o*/a/o, o*/a/o* (0,8 mg de nifedipino/ml) y o*/a/o* (1,6 mg de nifedipino/ml) son 996,5, 941,6 y 837,8 µg·cm⁻², respectivamente. La mayor cesión de nifedipino desde microemulsiones múltiples o*/a/o se debe a que la fase

externa se encuentra totalmente disponible para la solubilización del mismo, facilitando su partición hacia la fase continua e incrementando la fuerza de conducción ejercida sobre el nifedipino localizado en la fase interna. Todo esto se traduce en una mayor difusión del principio activo a través de la membrana. Lo comentado anteriormente, se aplica a las microemulsiones múltiples $o^*/a/o^*$ (1,6 mg de nifedipino/ml) y $o^*/a/o^*$ (0,8 mg de nifedipino/ml) para explicar la mayor cesión de principio activo desde aquellos sistemas dispersos con mayor disponibilidad de fase externa para la partición del fármaco.

Con el fin de evaluar el efecto reservorio de las microemulsiones múltiples desarrolladas, se estudia la cesión de nifedipino durante las 48 horas que dura el ensayo y se compara con la cesión de nifedipino desde una formulación control (múltiple microemulsión $o/a/o^*$ (1,6 mg de nifedipino/ml)). Como se puede observar en la figura 119, en las microemulsiones múltiples $o^*/a/o$ y $o^*/a/o^*$ se obtienen perfiles de cesión del principio activo que se ajustan a cinéticas de orden cero mientras que, la cesión de nifedipino desde la formulación control se ajusta a una cinética de orden uno.

Esta diferencia en las cinéticas de cesión se debe, por un lado, a que la fase externa oleosa de la microemulsión múltiple ayuda a la partición del nifedipino desde la fase interna a la externa y por otro lado, al efecto reservorio que se origina por la incorporación del principio activo localizado en la fase interna oleosa, dando lugar a un gradiente de concentración positivo hacia la fase externa y posteriormente, al compartimento receptor.

En la tabla 66 se recogen los porcentajes de nifedipino cedidos a las 24 y 48 horas desde las distintas formulaciones:

<i>Microemulsión</i>	<i>Cantidad cedida (% Dosis)</i>		
	<i>1 h</i>	<i>24 h</i>	<i>48 h</i>
<i>o/a/o* (Control)</i>	1,60±0,57	25,85±1,76	37,49±1,87
<i>o*/a/o</i>	0,05±0,01	34,67±2,06	53,02±2,99
<i>o*/a/o* (0,8 mg de nifedipino/ml)</i>	0,23±0,09	32,04±1,92	49,80±2,78
<i>o*/a/o* (1,6 mg de nifedipino/ml)</i>	0,27±0,11	20,86±1,61	39,22±1,95

Tabla 66. Porcentajes de nifedipino cedidos a través de piel de rata desde microemulsiones múltiples $o/a/o$ a distintos tiempos en función de la cantidad de nifedipino incorporado en la fase interna y externa.

Los porcentajes de nifedipino que se ceden en mayor magnitud durante la primera hora de ensayo, a través de la membrana de PVDF, corresponden a las formulaciones con principio activo incorporado en la fase externa. Sin embargo, la formulación control cede mayor porcentaje de la dosis inicial, ya que la difusión del principio activo localizado en la fase externa no se encuentra regulada por la cantidad que difunde desde la fase interna a la externa. Al realizar un análisis estadístico de varianza (ANOVA) no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes cedidos desde las microemulsiones múltiples $o^*/a/o^*$ (0,8 mg de nifedipino/ml) y $o^*/a/o^*$ (1,6 mg de nifedipino/ml).

Como se puede observar a las 24 y 48 horas de ensayo, el mayor porcentaje cedido de la dosis administrada corresponde a la microemulsión múltiple $o^*/a/o$. En

función de los resultados obtenidos se puede decir que a medida que disminuye la cantidad de nifedipino incorporada en la fase externa, aumenta la fuerza de conducción ejercida sobre el principio activo localizado en la fase interna. De esta manera, se favorece la partición del nifedipino hacia la fase externa dando lugar a una mayor cesión de nifedipino.

A las 24 horas de ensayo, el porcentaje cedido de nifedipino desde las microemulsiones múltiples objeto de estudio está comprendido entre el 20,9 y el 34,7%. Al realizar un ANOVA no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes cedidos desde los sistemas dispersos o/a/o* y o*/a/o*_(1,6 mg de nifedipino/ml) y desde los sistemas dispersos o*/a/o y o*/a/o*_(0,8 mg de nifedipino/ml).

A las 48 horas de ensayo, el porcentaje cedido de nifedipino desde las microemulsiones múltiples está comprendido entre el 37,5 y el 53,0%. No se aprecian diferencias estadísticamente significativas al realizar un ANOVA entre los porcentajes cedidos desde las microemulsiones múltiples o/a/o* y o*/a/o*_(1,6 mg de nifedipino/ml) y desde las microemulsiones múltiples o*/a/o y o*/a/o*_(0,8 mg de nifedipino/ml).

La tabla 67 muestra los coeficientes de permeabilidad y los tiempos de latencia de las microemulsiones múltiples o/a/o objeto de estudio.

<i>Microemulsión múltiple</i>	<i>$K_p \cdot 10^3 \text{ (cm} \cdot \text{h}^{-1}\text{)}$</i>	<i>$t_l \text{ (horas)}$</i>
<i>o/a/o* (Control)</i>	7,90±0,063	0,63 ±0,008
<i>o*/a/o</i>	4,87±0,049	2,41 ±0,032
<i>o*/a/o*_(0,8 mg de nifedipino/ml)</i>	4,71±0,052	1,08 ±0,019
<i>o*/a/o*_(1,6 mg de nifedipino/ml)</i>	3,29±0,036	0,82 ±0,010

Tabla 67. Coeficientes de permeabilidad (K_p) y tiempos de latencia (t_l) de las microemulsiones múltiples o/a/o (microemulsión primaria o/a/Brij® 96/PEG 400/IPM; 20/30/50; p/p/p) en función de la concentración de nifedipino presente en la fase interna y externa.

Los coeficientes de permeabilidad (K_p) se calculan en el estado estacionario de los perfiles de cesión de cada formulación, considerando la concentración total de fármaco presente en las mismas. Es interesante destacar que los K_p obtenidos desde las microemulsiones múltiples o*/a/o, o*/a/o*_(0,8 mg de nifedipino/ml) y o*/a/o*_(1,6 mg de nifedipino/ml) están relacionados con la fuerza de conducción que ejerce la fase externa sobre el nifedipino localizado en la fase interna. Por lo tanto, está fuerza de conducción es mayor en aquellas microemulsiones múltiples con menor saturación de nifedipino en la fase continua, en las que se obtiene un mayor valor de K_p .

La formulación control presenta un valor de K_p superior respecto al resto de formulaciones, debido a que todo el nifedipino localizado en la fase externa está disponible para la cesión, la cual no está regulada por la presencia de principio activo localizado en la fase interna.

El tiempo de latencia constituye el principal factor limitante para sistemas de liberación transdérmicos como las microemulsiones. El 10% del tiempo de exposición del sistema de liberación transdérmico se considera como valor límite de tiempo de

latencia (Mc Daid y Deasy, 1996). Debido a que en los ensayos de cesión, el tiempo de exposición de las microemulsiones múltiples desarrolladas en este apartado es de 48 horas, los tiempos de latencia obtenidos no impiden que se puedan emplear dichas formulaciones como sistemas de liberación transdérmicos.

La incorporación de nifedipino en la fase externa de las microemulsiones múltiples disminuye considerablemente el tiempo necesario para que el principio activo atraviese la membrana biológica (piel de rata) y alcance el compartimento receptor. En este tipo de formulaciones, el nifedipino no tiene que difundir desde la fase dispersa a la fase continua para que se produzca la absorción. En la formulación control, el tiempo de latencia es menor que en el resto de las microemulsiones múltiples debido a la rápida cesión del principio activo incorporado en la fase externa.

La figura 120 representa los flujos de nifedipino desde las microemulsiones múltiples objeto de estudio a través de piel de rata.

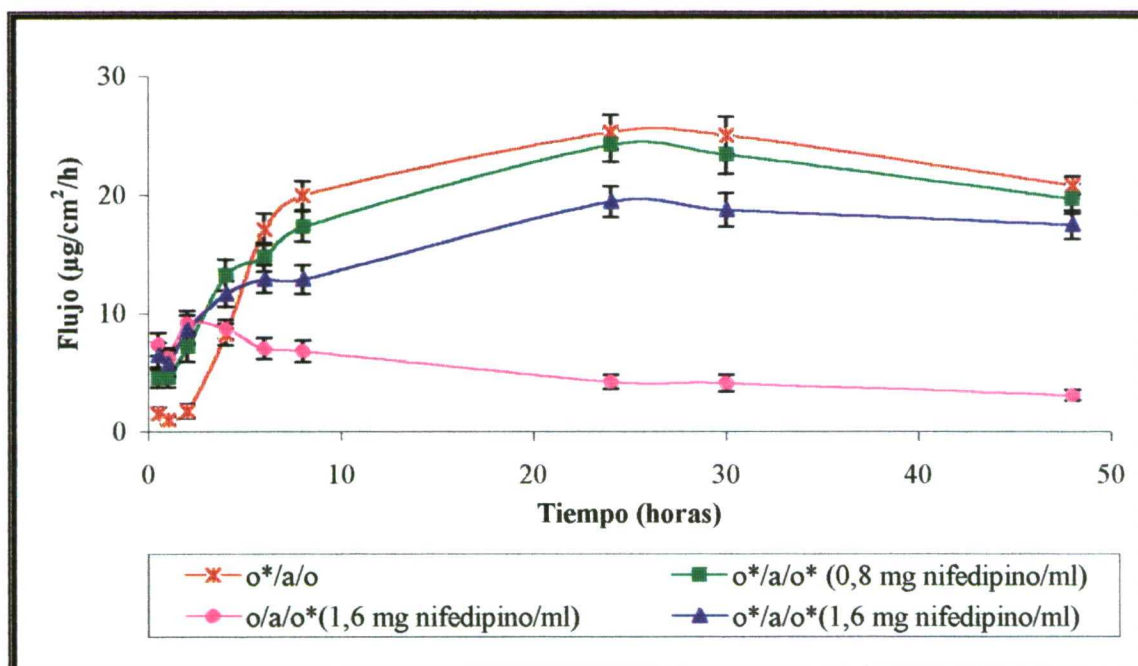


Figura 120. Flujos de nifedipino a través de piel de rata desde microemulsiones múltiples o*/a/o, o*/a/o* (0,8 mg de nifedipino/ml), o*/a/o* (1,6 mg de nifedipino/ml) y o/a/o* en función del tiempo.

Durante las dos primeras horas de ensayo, los mayores valores de flujo se obtienen desde las microemulsiones múltiples donde el nifedipino se incorpora en la fase externa. Los valores medios de flujo, obtenidos durante este tiempo, para los sistemas dispersos o/a/o*, o*/a/o* (1,6 mg de nifedipino/ml) y o*/a/o* (0,8 mg de nifedipino/ml) son 7,6, 6,9 y 5,4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, respectivamente.

A las 4 horas de ensayo, debido a la fuerza de conducción que ejerce la fase externa sobre el principio activo incorporado en la fase interna, los mayores valores de flujo se obtienen desde las microemulsiones múltiples o*/a/o*. Los valores de flujo para los sistemas dispersos o*/a/o* (0,8 mg de nifedipino/ml), o*/a/o* (1,6 mg de nifedipino/ml) y o/a/o* son 13,2, 11,6 y 8,6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, respectivamente. Por el contrario, la microemulsión múltiple

o*/a/o presenta un valor de flujo inferior ($8,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$), debido a que el nifedipino debe difundir desde la fase interna a la externa.

A partir de las 4 horas de ensayo hasta la finalización del mismo, las microemulsiones múltiples con nifedipino incorporado en la fase interna presentan mayores valores de flujo. En concreto, aquellos sistemas dispersos con menor saturación de principio activo en la fase externa son los que presentan un mayor valor de este parámetro. Los perfiles de flujo de los sistemas dispersos o*/a/o, o*/a/o*_(0,8 \text{ mg de nifedipino/ml}) y o*/a/o*_(1,6 \text{ mg de nifedipino/ml}) se caracterizan por un aumento progresivo del flujo hasta las 24 horas de ensayo con valores de 25,2, 24,1 y $19,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, respectivamente. Posteriormente, en estos sistemas dispersos se produce una disminución del flujo hasta las 48 horas de ensayo con valores comprendidos entre 17,4 y $20,7 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$.

En las microemulsiones múltiples o/a/o* se produce una disminución progresiva del flujo desde las 4 horas hasta la finalización del ensayo ($3,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$).

Los flujos obtenidos en el estado estacionario para las microemulsiones múltiples o*/a/o, o*/a/o*_(0,8 \text{ mg de nifedipino/ml}), o*/a/o*_(1,6 \text{ mg de nifedipino/ml}) y o/a/o*_(1,6 \text{ mg de nifedipino/ml}) son 19,4, 18,7, 14,5 y $6,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, respectivamente.

A partir de los flujos obtenidos en el estado estacionario, es posible calcular la cantidad absorbida durante 24 horas a través de la membrana biológica (piel de rata) utilizada en nuestros estudios, asumiendo un área razonable de exposición ($10\text{-}30 \text{ cm}^2$) (Ruan y cols, 1992; McDaid y Deasy, 1996). Así para un área de difusión de 30 cm^2 las cantidades absorbidas a través de piel de rata desde las microemulsiones múltiples o*/a/o, o*/a/o*_(0,8 \text{ mg de nifedipino/ml}), o*/a/o*_(1,6 \text{ mg de nifedipino/ml}) y o/a/o*_(1,6 \text{ mg de nifedipino/ml}) son 13,9, 13,5, 10,4 y 4,5 mg de nifedipino, respectivamente.

De todas las microemulsiones múltiples desarrolladas, únicamente los sistemas dispersos o*/a/o, o*/a/o*_(0,8 \text{ mg de nifedipino/ml}) permiten alcanzar niveles terapéuticos de nifedipino diarios (13 mg) (Diez y cols., 1991) con un área razonable de difusión (30 cm^2). La cantidad cedida de nifedipino obtenida desde estas formulaciones se debe fundamentalmente a la fuerza de conducción que ejerce la fase externa sobre el nifedipino incorporado en la fase interna (microemulsión primaria o/a). De esta manera, aumenta el gradiente de concentración del nifedipino hacia la fase externa y posteriormente a través de membrana. Este efecto es más significativo, como se ha comentado anteriormente, cuando la fase externa (IPM) presenta mayor disponibilidad para la solubilización del principio activo, es decir cuando la cantidad de nifedipino que se incorpora es menor. Por otra parte, el PEG 400 podría ejercer un efecto sinérgico al favorecer la partición del nifedipino desde la fase interna a la fase acuosa externa de la microemulsión primaria (o/a).

Es importante destacar el papel que desempeña el vehículo en la elevada absorción de nifedipino a través de la piel de rata. Basándonos en estudios realizados por microscopía electrónica de fractura por congelación y "double-labelling" (Thacharodi y Panduranga Rao, 1994), las microemulsiones podrían penetrar a través del estrato córneo y alcanzar sin ningún tipo de alteración la capa de células corneas

(corneocitos). Una vez que la microemulsión penetra en el estrato córneo podría alterar los caminos lipídicos y polares que constituyen la ruta intercelular (principal ruta en la absorción transdérmica de fármacos).

El dominio lipófilo de las microemulsiones puede interaccionar con el estrato córneo de dos maneras: 1) el nifedipino disuelto en el dominio lipófilo de la microemulsión puede particionar directamente hacia los lípidos del estrato córneo y 2) el dominio lipófilo del sistema disperso puede intercalarse entre los dominios lipídicos del estrato córneo desestabilizando la estructura, en forma de bicapa, que constituyen los lípidos neutros que forman la ruta intercelular. Ambas interacciones incrementarían la permeabilidad del nifedipino a través de la ruta lipídica

Por otra parte, el dominio hidrófilo de la microemulsión podría producir un incremento de la hidratación del estrato córneo. Se conoce que la hidratación de la piel desempeña un papel importante en la absorción transdérmica de fármacos. Por lo tanto, cuando el dominio hidrófilo interacciona con el camino polar de la ruta intercelular provoca un incremento del volumen interlamelar de la bicapa lipídica del estrato córneo. Este efecto resulta en una alteración de la estructura interfacial de la bicapa lipídica. Además, debido a que algunas cadenas lipídicas se unen covalentemente a las proteínas de superficie de las células córneas, la hidratación de estas proteínas provocaría, también, una alteración de la estructura de las bicapas lipídicas.

El hinchamiento de las proteínas intercelulares, también, altera la estructura de la bicapa, permitiendo que el nifedipino (compuesto lipófilo) pueda absorberse más fácilmente a través del camino lipídico (Thacharodi y Panduranga, 1994). Por último, el IPM (fase interna y externa de la microemulsión múltiple o/a/o), debido a su efecto promotor, puede incrementar el flujo de nifedipino a través de la piel de rata por interacción del éster con la piel. Esta interacción acelera los cambios conformacionales de los lípidos del estrato córneo. (Inagi y cols, 1981; Miyazaki y cols., 1994).

6.4.- Estudios de cesión in vitro de nifedipino a través de piel de rata desde microemulsiones múltiples o/a/o constituidas por microemulsión primaria o/a, Brij® 96, propilenglicol y IPM.

El estudio de cesión de nifedipino desde la microemulsión múltiple o/a/o seleccionada (microemulsión primaria o/a/ Brij® 96/PG/IPM; 20/30/50; p/p/p, con una relación fija Brij® 96/PG de 3:1), empleando un modelo de animal, nos ayuda a predecir si la absorción de nifedipino a través de piel humana es adecuada para la obtención de niveles terapéuticos en sangre.

Además, este estudio permite determinar, en función de la cantidad de nifedipino incorporada en la fase externa, el uso potencial de la microemulsión múltiple o/a/o como vehículo para la administración transdérmica de nifedipino

En nuestros estudios de cesión se utiliza la rata como modelo de animal. Este modelo es empleado en la mayoría de los estudios de cesión in vitro realizados por distintos autores con una gran variedad de fármacos (Miyazaki y cols, 1994; Mac Daid

y cols, 1996; Vora y cols, 1998). Por otra parte, se determinan una serie de parámetros (coeficiente de permeabilidad, flujo, cantidad cedida, etc.) con el fin de explicar y evaluar la absorción del nifedipino a través de piel de rata.

6.4.1.- Preparación de las microemulsiones

Se desarrollan distintas microemulsiones múltiples o/a/o constituidas por 20% microemulsión primaria o/a, 30% Brij® 96/PG y 50% IPM a una relación fija Brij® 96/PG 400 3:1, con variaciones en la cantidad de principio activo incorporada en la fase externa. También, se prepara una formulación control con la misma composición cuantitativa y cualitativa sin nifedipino incorporado en la fase externa.

- Método:

El desarrollo galénico de las microemulsiones múltiples o/a/o formuladas en esta sección, así como la incorporación del principio activo en la fase interna y externa se describen ampliamente en el *apartado 5.3* de la presente memoria. El superíndice “*” utilizado en la notación de todas las microemulsiones múltiples indica la presencia de nifedipino en la fase interna, externa o en ambas.

Para evaluar el efecto de la incorporación de nifedipino en la fase externa (IPM) sobre el perfil de cesión de la múltiple microemulsión o/a/o (microemulsión primaria o/a/ Brij® 96/PG /IPM; 20/30/50, p/p/p a una relación fija Brij® 96/PG 3:1 (p/p)) se procede a la incorporación de las siguientes cantidades de principio activo: 0, 4 y 8 mg que corresponden, respectivamente, a las concentraciones de 0, 0,8 y 1,6 mg·ml⁻¹. La concentración de nifedipino presente en la fase interna se mantiene constante a 18 mg·ml⁻¹. Como formulación control se desarrolla la misma microemulsión múltiple con la máxima concentración de nifedipino presente en la fase externa (1,6 mg·ml⁻¹).

6.4.2.- Estudios de cesión in vitro

- Método:

Los estudios de absorción in vitro a través de piel de rata se realizan con las microemulsiones múltiples o/a/o desarrolladas en el *apartado 6.3.1.*, variando la cantidad de nifedipino incorporada en la fase externa.

- Obtención y preparación de piel de rata: se utilizan ratas hembra de la raza Sprague-Dawley con un peso comprendido entre 200-300 g. Las ratas son anestesiadas mediante una inyección intraperitoneal de fenobarbital (40 mg·kg⁻¹). Se afeita La zona abdominal mediante la utilización de tijeras y una maquinilla eléctrica. Posteriormente, se aplica crema depilatoria en la zona afeitada durante 5 minutos y entonces, se limpia con la ayuda de una espátula de plástico y algodón.

Después, la piel abdominal se obtiene quirúrgicamente por incisión en un costado del animal, separando del tejido conectivo localizado debajo de la misma con la

ayuda de un escalpelo. El animal se sacrifica inmediatamente con una inyección de fenobarbital. La grasa adherida a la piel se elimina cuidadosamente con unas tijeras.

La dermis de la piel se pone en contacto con solución salina (0,1M NaCl) durante 30 minutos antes de empezar el ensayo con el fin de eliminar restos de tejidos, sangre y enzimas. La piel se utiliza, inmediatamente, después en los ensayos de cesión manteniendo su integridad.

- Celda de difusión: los estudios de cesión de nifedipino desde las microemulsiones múltiples o/a/o objeto de estudio, se realizan en una celda de difusión de Franz constituida por un compartimento donador y un compartimento receptor con un área total disponible para la difusión de 2,06 cm². El compartimento receptor se llena con 12,5 ml de una mezcla de tampón fosfato (0,2 M, pH=6,0)/propilenglicol (70/30; v/v), a pH 7,4, para mantener condiciones sink (Ruan y cols, 1992; Megrab y cols, 1995). La piel se sitúa entre el compartimento donador y receptor, unidos mediante un dispositivo de sujeción, con el estrato córneo hacia el compartimento donador y la dermis hacia el compartimento receptor.

El compartimento receptor se agita a 300 r.p.m y se encuentra termostatzado a 37°C durante todo el experimento mediante el paso continuo de agua a través de una doble camisa localizada en este compartimento. El compartimento donador se sella con parafilm para evitar posibles fenómenos de evaporación e imitar, de esta manera, las condiciones in vivo. Antes de iniciar el experimento todo el sistema se mantiene en equilibrio durante 30 minutos.

- Muestreo y valoración del nifedipino: se toman 0,75 ml de muestra del compartimento receptor a la 1, 2, 4, 6, 8, 24, 30 y 48 horas y se reemplaza con el mismo volumen de fluido receptor (tampón fosfato (0,2 M, pH=6,0)/propilenglicol (70/30; v/v)). La cesión de nifedipino desde las formulaciones objeto de estudio a través de la membrana biológica se evalúa durante 48 horas. La concentración del fármaco presente en las muestras se determina por espectrofotometría UV/Visible a una $\lambda = 237,5$ utilizando como blanco el medio receptor. Todo el sistema así como, las muestras tomadas a cada intervalo de tiempo se protegen de la luz durante el tiempo que dura el ensayo con el fin de evitar la degradación del principio activo. Los ensayos se realizan por cuadruplicado (n=4).

- Tratamiento de datos: el tratamiento y análisis estadístico de los datos obtenidos en los estudios de cesión in vitro se ha descrito detalladamente en el apartado 6.1.3.

El tiempo de latencia (t_l) se determina por extrapolación al eje x de la porción lineal de los perfiles de cesión, obtenidos al representar la cantidad de nifedipino que se absorbe por unidad de superficie frente al tiempo.

- Resultados y comentarios:

La cesión de nifedipino desde las microemulsiones múltiples o/a/o (microemulsión primaria o/a/ Brij® 96/PG/IPM; 20/30/50; p/p/p, con una relación fija

Brij® 96/PG de 3:1) se encuentra gobernada principalmente por la transferencia del fármaco desde la fase dispersa a la fase continua y por la difusión del fármaco a través de la piel desde la fase continua al medio receptor (condiciones sink).

La difusión de nifedipino desde la fase interna a la externa en las microemulsiones múltiples o/a/o se encuentra influenciada por tres posibles mecanismos:

-1) La formación “in situ” de micelas inversas en las fases oleosas que constituyen el sistema disperso objeto de estudio. La validez de este mecanismo depende de la naturaleza del tensioactivo que forma la micela. Se ha demostrado que las micelas inversas se forman en la fase oleosa de sistemas dispersos estabilizados por tensioactivos monoméricos, como es el caso del Brij® 96 (Sela Y. y cols., 1995). En este caso, el transporte de nifedipino a través de micelas inversas sería uno de los posibles mecanismos que facilitaría la migración del fármaco desde la fase interna oleosa a la fase externa oleosa.

- 2) La presencia de cotensioactivos (propilenglicol y PEG 400) desempeñan un papel importante en la cesión del nifedipino desde la microemulsión múltiple o/a/o. Estos solventes facilitan la partición del principio activo desde las distintas fases que constituyen el sistema disperso debido a la alta solubilidad que presenta el nifedipino en los mismos.

- 3) La fuerza conductora que ejerce la fase externa oleosa (IPM) sobre el nifedipino (molécula de marcado carácter lipófilo), localizado en la fase interna oleosa, facilita la partición del principio activo desde la fase oleosa a la acuosa de la microemulsión primaria y posteriormente hacia la fase dispersa de la microemulsión múltiple o/a/o.

La figura 121 representa la cantidad cedida acumulada de nifedipino, en función del tiempo, a través de piel de rata desde diferentes microemulsiones múltiples o/a/o constituidas por microemulsión primaria (o/a)/Brij® 96/PG/IPM; 20/30/50 (p/p/p) a una relación fija Brij® 96/PG de 3:1. En todas las formulaciones la cantidad de principio activo incorporado en la fase interna se mantiene constante, ya que el porcentaje de fase interna presente en las microemulsiones múltiples es el mismo (20 % de fase interna con una concentración de nifedipino de $18 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), mientras que varía la concentración de nifedipino incorporado en la fase externa.

Se estudia la incorporación de distintas concentraciones de nifedipino en la fase continua de la microemulsión múltiple o/a/o, con el fin de evaluar el efecto que ejerce el aumento de dicha concentración sobre los perfiles de cesión del principio activo desde la formulación seleccionada a través de piel de rata.

La incorporación de nifedipino en la fase continua ($0,8$ y $1,6 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de nifedipino) de las microemulsiones múltiples o*/a/o* favorece la cesión de nifedipino a través de la membrana biológica (piel de rata) durante las cuatro primeras horas de ensayo. En comparación con el perfil de cesión de nifedipino desde la microemulsión múltiple o*/a/o, la cantidad cedida de nifedipino desde los sistemas dispersos con $0,8$ y

1,6 mg·ml⁻¹ de nifedipino en la fase continua es del orden de 5,7 y 7,2 veces superior a la hora de ensayo, 6,2 y 7,2 veces superior a las 2 horas de ensayo y de 2,2 y 2,0 veces superior a las 4 horas de ensayo, respectivamente. Este hecho se puede explicar, en el caso de las microemulsiones múltiples o*/a/o*, por la rápida difusividad del principio activo a través de la membrana desde la fase externa al compartimento receptor. Por el contrario, en la microemulsión múltiple o*/a/o el nifedipino tiene que difundir, durante la primera hora de ensayo, desde la fase interna a la externa.

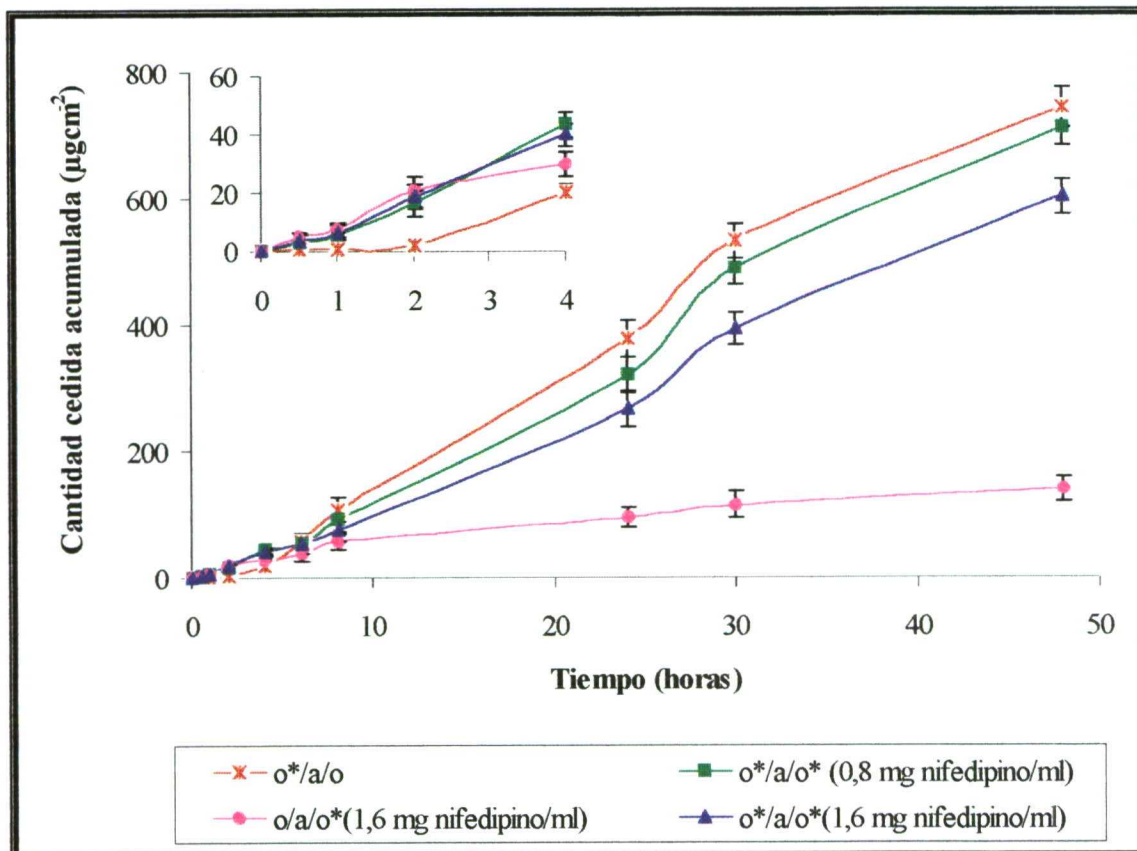


Figura 121. Perfiles de cesión in vitro de nifedipino desde microemulsiones múltiples o/a/o (microemulsión primaria (o/a)/Brij® 96/PG/IPM; 20/30/50, p/p/p) a través de piel de rata con 36 mg de nifedipino incorporado en fase interna y distintas concentraciones de nifedipino en fase externa (0, 0,8 y 1,6 mg·ml⁻¹) y una formulación control (microemulsión primaria (o/a)/Brij® 96/PG/IPM; 20/30/50, p/p/p) con 1,6 mg·ml⁻¹ de nifedipino en la fase externa.

A partir de las 4 horas de ensayo hasta la finalización del mismo existe un aumento de la cesión de nifedipino, en cuanto a velocidad y magnitud, desde microemulsiones múltiples o*/a/o respecto a los sistemas o*/a/o*. A las 24 horas, las cantidades cedidas acumuladas de nifedipino desde las microemulsiones múltiples o*/a/o, o*/a/o* (0,8 mg de nifedipino/ml) y o*/a/o* (1,6 mg de nifedipino/ml) son 377,7, 322,1 y 256,8 µg·cm⁻², respectivamente. Mientras que, a las 48 horas de ensayo las cantidades cedidas de nifedipino desde las microemulsiones múltiples o*/a/o, o*/a/o* (0,8 mg de nifedipino/ml) y o*/a/o* (1,6 mg de nifedipino/ml) son 743,2, 712,3 y 602,1 µg·cm⁻², respectivamente. La mayor cesión de nifedipino desde las microemulsiones múltiples o*/a/o se debe a la total disponibilidad de la fase externa para la solubilizar el nifedipino, facilitando la partición hacia la fase continua e incrementando la fuerza de conducción que ejerce sobre el principio activo localizado en la fase interna. El resultado final es una mayor

difusión del principio activo a través de la membrana. Para explicar la mayor cesión de principio activo desde aquellos sistemas con mayor disponibilidad de fase externa para la partición del fármaco se puede aplicar, lo comentado anteriormente, a las microemulsiones múltiples o*/a/o* (1,6 mg de nifedipino/ml) y o*/a/o* (0,8 mg de nifedipino/ml).

Con el fin de evaluar el efecto reservorio de las microemulsiones múltiples desarrolladas, se estudia la cesión de nifedipino desde estas formulaciones durante 48 horas y se compara con la cesión de nifedipino desde una formulación control (múltiple microemulsión o/a/o* (1,6 mg de nifedipino/ml)).

Como se puede observar en la figura 121, en las microemulsiones múltiples o*/a/o y o*/a/o* se obtienen perfiles de cesión del principio activo que se pueden ajustar a cinéticas de orden cero mientras que, la cesión de nifedipino desde la formulación control se ajusta a una cinética de orden uno.

El distinto comportamiento en la cesión de nifedipino desde los sistemas dispersos o*/a/o y o*/a/o* respecto a la formulación control se debe, por un lado, a que la fase externa oleosa de la microemulsión múltiple ayuda a la partición del nifedipino desde la fase interna a la externa y por otro lado, al efecto reservorio del principio activo localizado en la fase interna oleosa que permite un gradiente de concentración positivo hacia la fase externa y de aquí al compartimento receptor.

En la tabla 68 se recogen los porcentajes cedidos de nifedipino a las 24 y 48 horas desde las distintas formulaciones:

Formulación	Cantidad cedida (% Dosis)		
	1 h	24 h	48 h
<i>o/a/o* (Control)</i>	1,89±0,61	24,74±1,81	35,69±2,17
<i>o*/a/o</i>	0,04±0,02	21,61±1,72	41,53±2,25
<i>o*/a/o* (0,8 mg de nifedipino/ml)</i>	0,28±0,06	19,69±1,59	38,92±1,92
<i>o*/a/o* (1,6 mg de nifedipino/ml)</i>	0,30±0,07	12,44±1,09	28,19±1,83

Tabla 68. Porcentajes de nifedipino cedidos a través de piel de rata desde microemulsiones múltiples o/a/o a distintos tiempos en función de la cantidad de nifedipino incorporado en la fase interna y externa.

Los porcentajes de nifedipino que se ceden en mayor magnitud durante los primeros instantes del ensayo, a través de la membrana de PVDF, corresponden a las formulaciones con principio activo incorporado en la fase externa. Sin embargo, la formulación control cede el mayor porcentaje de la dosis inicial, ya que la difusión del principio activo, localizado en la fase externa, no se encuentra regulado por la cantidad de nifedipino que difunde desde la fase interna a la externa. Al realizar un análisis estadístico de varianza (ANOVA) no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes cedidos desde las microemulsiones múltiples o*/a/o* (0,8 mg de nifedipino/ml) y o*/a/o* (1,6 mg de nifedipino/ml).

A las 24 horas de ensayo, el porcentaje cedido de nifedipino desde las microemulsiones múltiples objeto de estudio esta comprendido entre el 12,4 y el 24,7%. Al realizar una ANOVA de los porcentajes cedidos desde las microemulsiones

múltiples o*/a/o, o*/a/o*_(0,8 mg de nifedipino/ml) y o*/a/o*_(1,6 mg de nifedipino/ml) no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los sistemas dispersos o*/a/o y o*/a/o*_(0,8 mg de nifedipino/ml).

A las 48 horas de ensayo, el porcentaje cedido de nifedipino desde las microemulsiones múltiples está comprendido entre el 37,5 y el 53,0%. Al realizar una ANOVA de los porcentajes cedidos desde las microemulsiones múltiples o*/a/o, o*/a/o*_(0,8 mg de nifedipino/ml) y o*/a/o*_(1,6 mg de nifedipino/ml) no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los sistemas dispersos o*/a/o y o*/a/o*_(0,8 mg de nifedipino/ml).

En función de los resultados obtenidos se puede concluir que, a medida que transcurre el ensayo, las microemulsiones múltiples con menor cantidad de nifedipino incorporada en la fase externa ejercen mayor fuerza de conducción sobre el principio activo localizado en la fase interna. De esta manera, se favorece la partición del nifedipino hacia la fase externa dando lugar a un mayor porcentaje de nifedipino cedido.

La tabla 69 muestra los coeficientes de permeabilidad y los tiempos de latencia de las microemulsiones múltiples o/a/o objeto de estudio.

<i>Microemulsión múltiple</i>	<i>$K_p \cdot 10^3 \text{ (cm} \cdot \text{h}^{-1}\text{)}$</i>	<i>$t_l \text{ (horas)}$</i>
o/a/o* (Control)	7,79±0,089	0,57 ±0,012
o*/a/o	3,55±0,043	2,90 ±0,041
o*/a/o* _(0,8 mg de nifedipino/ml)	3,01±0,029	1,11 ±0,021
o*/a/o* _(1,6 mg de nifedipino/ml)	2,23±0,013	0,85 ±0,012

Tabla 69. Coeficientes de permeabilidad (K_p) y tiempos de latencia (t_l) de las microemulsiones múltiples o/a/o (microemulsión primaria (o/a)/Brij® 96/PG/IPM; 20/30/50; p/p/p) en función de la concentración de nifedipino presente en la fase interna y externa.

Los coeficientes de permeabilidad (K_p) se calculan en el estado estacionario de los perfiles de cesión de cada formulación, considerando la concentración total de fármaco presente en las mismas.

Es interesante destacar que los K_p obtenidos desde las microemulsiones múltiples o*/a/o, o*/a/o*_(0,8 mg de nifedipino/ml) y o*/a/o*_(1,6 mg de nifedipino/ml) están relacionados con la fuerza de conducción que ejerce la fase externa sobre el nifedipino localizado en la fase interna. Por lo tanto, esta fuerza de conducción es mayor en aquellas microemulsiones múltiples con menor saturación de nifedipino en la fase continua, en las que se obtiene un mayor valor de K_p .

La formulación control presenta un valor de K_p superior respecto al resto de formulaciones, debido a que todo el nifedipino localizado en la fase externa está disponible para la cesión, la cual no está regulada por la presencia de principio activo localizado en la fase interna.

El tiempo de latencia constituye el principal factor limitante para sistemas de liberación transdérmicos como las microemulsiones. El 10% del tiempo de exposición

del sistema de liberación transdérmico se considera como valor límite de tiempo de latencia (Mc Daid y Deasy, 1996). Debido a que el tiempo de exposición de la microemulsiones múltiples, desarrolladas en este apartado, durante los ensayos de cesión es de 48 horas, los tiempos de latencia obtenidos no impiden que se puedan emplear dichas formulaciones como sistemas de liberación transdérmicos.

La incorporación de nifedipino en la fase externa de las microemulsiones múltiples disminuye considerablemente el tiempo necesario para que el principio activo atraviese la membrana biológica (piel de rata) y alcance el compartimento receptor. En este tipo de formulaciones, el nifedipino no tiene que difundir desde la fase dispersa a la fase continua para que se produzca la absorción. En la formulación control, el tiempo de latencia es menor que en el resto de microemulsiones múltiples, debido a la rápida cesión del principio activo incorporado en la fase externa que no se encuentra regulada por la presencia de nifedipino en la fase interna.

La figura 122 representa los flujos de nifedipino desde las microemulsiones múltiples, objeto de estudio, a través de piel de rata.

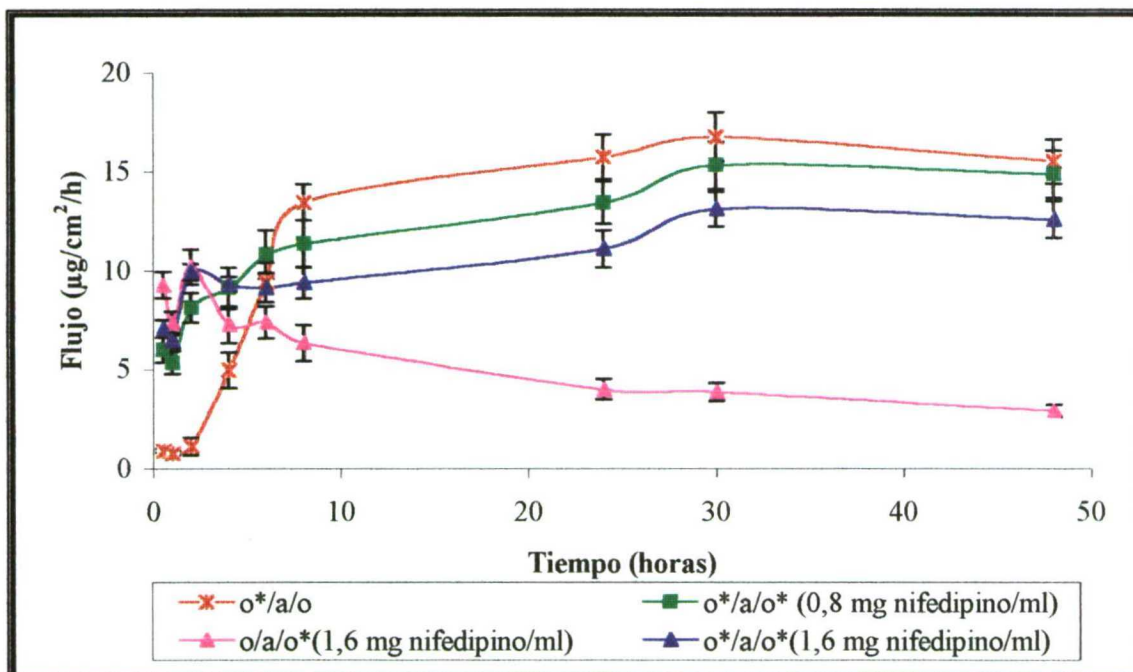


Figura 122. Flujos de nifedipino a través de piel de rata desde microemulsiones múltiples o*/a/o, o*/a/o* (0,8 mg de nifedipino/ml), o*/a/o* (1,6 mg de nifedipino/ml) y o/a/o* en función del tiempo.

Durante las dos primeras horas de ensayo, los mayores valores de flujo se obtienen desde las microemulsiones múltiples con nifedipino incorporado en la fase externa. Los valores medios de flujo obtenidos a este tiempo para los sistemas dispersos o/a/o*, o*/a/o* (1,6 mg de nifedipino/ml) y o*/a/o* (0,8 mg de nifedipino/ml) son 8,9, 7,8 y 6,4 µg/cm²/h, respectivamente.

A las 4 horas de ensayo, debido a la fuerza de conducción que ejerce la fase externa sobre el principio activo incorporado en la fase interna, los mayores valores de flujo se obtienen desde las microemulsiones múltiples o*/a/o*. Los valores de flujo

para los sistemas dispersos o*/a/o*_(0,8 mg de nifedipino/ml), o*/a/o*_(1,6 mg de nifedipino/ml) y o/a/o* son 9,3, 9,1 y 7,6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, respectivamente. Por el contrario, la microemulsión múltiple o*/a/o presenta menor valor de flujo (4,9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) debido a que el nifedipino debe difundir desde la fase interna a la externa.

Desde las 4 horas hasta la finalización del ensayo, las microemulsiones múltiples con nifedipino incorporado en la fase interna son las que presentan mayores valores de flujo. En concreto, aquellos sistemas dispersos con menor saturación de principio activo de la fase externa muestran mayor valor de este parámetro. Los perfiles de flujos de los sistemas dispersos o*/a/o, o*/a/o*_(0,8 mg de nifedipino/ml) y o*/a/o*_(1,6 mg de nifedipino/ml) se caracterizan por un aumento progresivo del flujo hasta las 30 horas de ensayo con valores de 16,7, 15,3 y 13,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. Posteriormente, en estos sistemas dispersos se produce una disminución del flujo hasta las 48 horas de ensayo con valores comprendidos entre 12,5 y 15,8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$.

En las microemulsiones múltiples o/a/o* se produce una disminución progresiva del flujo desde las 4 horas hasta la finalización del ensayo (2,9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$).

Los flujos obtenidos en el estado estacionario para las microemulsiones múltiples o*/a/o, o*/a/o*_(0,8 mg de nifedipino/ml), o*/a/o*_(1,6 mg de nifedipino/ml) y o/a/o*_(1,6 mg de nifedipino/ml) son 12,8, 12,0, 9,8 y 6,2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, respectivamente.

A partir de los flujos obtenidos en el estado estacionario, es posible calcular la cantidad absorbida durante 24 horas a través de la membrana biológica (piel de rata), asumiendo un área razonable de exposición de 10-30 cm^2 (Ruan y cols, 1992; McDaid y Deasy, 1996). Así, para un área de difusión de 30 cm^2 las cantidades cedidas a través de piel de rata desde las microemulsiones múltiples o*/a/o, o*/a/o*_(0,8 mg de nifedipino/ml), o*/a/o*_(1,6 mg de nifedipino/ml) y o/a/o*_(1,6 mg de nifedipino/ml) son 9,2, 8,6, 7,1 y 4,9 mg de nifedipino, respectivamente.

Las microemulsiones múltiples desarrolladas no son capaces de alcanzar niveles terapéuticos de nifedipino diarios (13 mg) con un área razonable de difusión (10-30 cm^2) (Diez y cols., 1991). La mayor cesión de nifedipino desde los sistemas dispersos o*/a/o y o*/a/o*_(0,8 mg de nifedipino/ml) se debe, fundamentalmente, a la fuerza de conducción que ejerce la fase externa sobre el nifedipino incorporado en la fase interna (microemulsión primaria o/a). De esta manera aumenta el gradiente de concentración del nifedipino hacia la fase externa y posteriormente, a través de membrana. Este efecto es más significativo cuanto mayor es la disponibilidad la fase externa (IPM) para solubilizar el principio activo, es decir, menor es la cantidad de principio activo incorporado en la misma. El PG, como el PEG 400, podría ejercer un efecto sinérgico al favorecer la partición del nifedipino desde la fase interna a la fase acuosa externa de la microemulsión primaria (o/a).

Por último, es interesante destacar la importancia que desempeña el vehículo en la absorción de nifedipino a través de piel de rata. Como se ha comentado detalladamente en el apartado 6.3., las microemulsiones pueden incrementar la absorción del principio activo por interacción de sus dominios lipófilos e hidrófilos con las regiones polares y lipídicas que constituyen la ruta intercelular (principal ruta para

la absorción de fármacos) del estrato córneo (Thacharodi y Panduranga, 1994). Por otro lado, debido a la capacidad que posee el IPM de acelerar los cambios conformacionales de los lípidos de la piel es muy probable que aumente la absorción de nifedipino a través de piel de rata (Inagi y cols, 1981; Miyazaki y cols., 1994).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1ª.- Los cuatro métodos utilizados para cuantificar el nifedipino: espectroscopía UV/Vis convencional en metanol, espectroscopía UV/Vis convencional en tampón fosfato pH=6,0/propilenglicol (70/30; v/v), espectrofotometría UV/Vis de primera derivada y HPLC, son lineales dentro del rango de concentración estudiado y cumplen con los parámetros de validación.

2ª.- La técnica analítica de espectrofotometría UV/Vis de primera derivada, al contrario de lo que ocurre con la espectrofotometría convencional UV/Vis, permite cuantificar el nifedipino a una $\lambda=387$ nm sin interferencia de su principal producto de degradación, derivado de nitrosofenilpiridina, obtenido por acción de la luz UV y la luz del día. La cuantificación de nifedipino con la espectrofotometría UV/Vis de primera derivada en estudios de estabilidad a luz se realiza de manera más rápida y sencilla que con la técnica de HPLC.

3ª.- Los estudios de estabilidad realizados con nifedipino nos permiten concluir que el nifedipino es fotosensible, pero es física y químicamente estable a una temperatura de almacenamiento entre 4 y 50°C y dentro de un intervalo de pH de 7 y 11.

4ª.- La incorporación de polietilenglicol 400 y propilenglicol a la microemulsión primaria o/a constituida por IPM/Brij® 96/agua permite incorporar mayor porcentaje de fase interna, dando lugar a la formación de diversas áreas de microemulsiones en función de las proporciones en peso de tensioactivo/cotensioactivo y del contenido total de los mismos. Así mismo, se observa que todos los parámetros estudiados sobre microemulsiones constituidas por IPM/Brij®/PG 96/agua son dependientes del contenido en fase dispersa y del tensioactivo y cotensioactivo utilizados.

5ª.- El desarrollo de microemulsiones primarias o/a constituidas por IPM/Brij® 96/agua, IPM/Brij® 96/PG/agua y IPM/ Brij® 96/PEG 400 /agua incrementa la solubilidad de nifedipino respecto a soluciones micelares equivalentes por la incorporación del principio activo en la fase dispersa, al constituir un núcleo hidrofóbico en la microemulsión o/a.

6ª.- De las microemulsiones primarias o/a estudiadas, se selecciona el sistema constituido por un 15% de fase interna, un 30% de tensioactivo/cotensioactivo con una relación Brij® 96/propilenglicol de 2:1 (p/p) como fase dispersa de la microemulsión múltiple, por su mayor capacidad de incorporar el principio activo y así alcanzar las concentraciones requeridas.

7ª.- La incorporación de polietilenglicol 400 y propilenglicol a las microemulsiones múltiples constituidas por microemulsión primaria (o/a)/ Brij®96/IPM permite incorporar mayor porcentaje de fase interna dando lugar a la formación de diversas áreas de microemulsiones múltiples, en función de las proporciones en peso de tensioactivo/cotensioactivo y del contenido total de los mismos. Así mismo, se observa que todos los parámetros estudiados son dependientes del contenido de fase dispersa y del tensioactivo y cotensioactivo utilizados.

8ª- De las microemulsiones múltiples o/a/o estudiadas se seleccionan los sistemas constituidos por microemulsión primaria (o/a)/ Brij®96/PG/IPM (20/30/50; p/p/p) y microemulsión primaria (o/a)/ Brij® 96/PEG 400 /IPM (20/30/50; p/p/p) a una relación fija tensioactivo/cotensioactivo de 3:1 en ambos sistemas, por su mayor capacidad para incorporar el principio activo.

9ª- Los estudios de estabilidad realizados sobre las microemulsiones múltiples o/a/o de nifedipino seleccionadas demuestran que:

a) Únicamente se observa una ligera inestabilidad química en los sistemas constituidos por microemulsión primaria (o/a)/ Brij®96/PG/IPM almacenadas a 40°C y 75% de HR. Así mismo, se observa una ligera inestabilidad física en el tercer y primer mes de estudio en las microemulsiones múltiples o/a/o de nifedipino seleccionadas que se almacenan a 30°C y 60% de humedad relativa y a 40°C y 75% de humedad relativa, respectivamente.

b) Se mantienen física y químicamente estables a los tests de centrifugación y a los ciclos de congelación/descongelación a los que se someten.

10ª- Los estudios de cesión de nifedipino desde las microemulsiones múltiples o/a/o a través de la membrana artificial de PVDF demuestran que:

a) La cesión de nifedipino está influenciada por la concentración de principio activo en la fase continua, el contenido total tensioactivo/cotensioactivo, la relación tensioactivo/cotensioactivo y el contenido en fase dispersa.

b) En función de los distintos parámetros estudiados, los sistemas constituidos por microemulsión primaria (o/a)/ Brij® 96/PG/IPM (20/30/50; p/p/p) y microemulsión primaria (o/a)/Brij® 96/PEG 400/IPM (20/30/50; p/p/p), a una relación fija tensioactivo/cotensioactivo de 3:1, presentan mayores valores de flujo en el estado estacionario y ceden mayor cantidad de nifedipino.

11ª- Las microemulsiones múltiples o/a/o, a diferencia de las microemulsiones o/a, debido a la presencia de la fase continua oleosa, ejercen una fuerza de conducción sobre el nifedipino localizado en la fase dispersa (microemulsión primaria o/a) favoreciendo su cesión a través de la membrana. Así mismo, la presencia de esta fase externa oleosa permite la incorporación de nifedipino dando lugar a una disminución del tiempo de latencia.

12ª- Los estudios de cesión a través de piel de rata permiten concluir que el sistema constituido por microemulsión primaria (o/a)/ Brij®96/PEG 400/IPM (20/30/50; p/p/p), a una relación tensioactivo/cotensioactivo 3:1 logra alcanzar niveles terapéuticos de nifedipino diarios de aproximadamente 13 mg con un área razonable de difusión de 30 cm², pudiendo constituir una formulación adecuada para la administración transdérmica de nifedipino a través de piel humana.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Aboofazeli, R.; Lawrence, C.B.; Wicks, S.R.; Lawrence, M.J.; "Investigations into the formation and characterization of phospholipids microemulsions. III. Pseudo-ternary phase diagrams of systems containing water-lecithin-isopropyl myristate and either an alkanolic or alcohol as surfactant." *International Journal of Pharmaceutics*, 107, 63-72, (1994).

Aboofazeli, R.; Lawrence, M.J.; "Investigations into the formation and characterization of phospholipid microemulsion: I. Pseudo-ternary phases diagrams of systems containing water-lecithin-alcohol-isopropyl myristate." *International Journal of Pharmaceutics*, 93, 161-175, (1993).

Ahmad, S.; "Nifedipine-phenytoin interaction." *Journal of the American College of Cardiology*, 3, 1582, (1984b).

Arima, H.; Miyaji, T.; Irie, T.; Hirayama, F.; Uekama, K.; "Possible enhancing mechanism of the cutaneous permeation of 4-biphenylacetic acid by β -cyclodextrin derivatives in hydrophilic ointment." *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 44, 582-586, (1996).

Arnason, T.; Elworthy, P.H.; "Effects of structural variations of non-ionic surfactants on micellar properties and solubilization: surfactants based on erucyl and behenyl (C_{22}) alcohols." *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 32, 381-384, (1980).

Astley, J.P.; Levine, M.; "Effect of dimethyl sulfoxide on permeability of human skin in vitro." *Journal of Pharmaceutical Science*, 65, 210-215, (1976).

Atwood, D.; Mallon, C.; Taylor, C.J.; "Phase studies on oil-in-water phospholipid microemulsions." *International Journal of Pharmaceutics*, 84, R5-R8, (1992).

Auricchio, R. J.; "Digoxin interactions with calcium channel blockers." *Drugs interactions Newsletter*, 3, 45-48, (1983).

Aveyard, R.; Binks, B.P.; Fletcher, P.D.I.; "Interfacial tensions and aggregate structure in $C_{12}E_5$ /oil/water microemulsion system." *Langmuir*, 5, 1210-1213, (1989).

Barr, M.; "Percutaneous absorption." *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 61, 395-409, (1962).

Barry, B.W.; "Topical preparations." En: Aulton, M.E., *Pharmaceutics (Chapter 22)*. Churchill Livingstone, Edinburgh, 381-411, (1988).

Barry, B.W.; Williams, A.C.; "Percutaneous absorption." En: Swarbrick, J., Boylan, J.C., *Encyclopaedia of Pharmaceutical Technology. Vol. 11*. Marcel Dekker, Inc. New York, 413-445, (1995).

Barry, B.W.; Williams, A.C.; "Permeation enhancement through skin." En: Swarbrick, J., Boylan, J.C., *Encyclopaedia of Pharmaceutical Technology. Vol. 11.* Marcel Dekker, Inc. New York, 449-493, (1995).

Bartolotti, M.; Labo, G.; "Clinical and manometric effects of nifedipine in patients with esophageal achalasia." *Gastroenterology*, 80, 39-44, (1981).

Belz, G. G.; Doering, W.; Munkes, R.; Mathews, J.; "Interaction between digoxin and calcium antagonists and antiarrhythmic drugs." *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 33, 410-417, (1983).

Bennett, S.L.; Barry, B.W.; "The use of human scalp and abdominal skin as in vitro models for percutaneous absorption." En: Marks, R., Plewig, D.; *Skin Models; Models to Study Function and Disease of Skin. Vol. 11.* Springer-Verlag, Berlin, 245, 447, (1987).

Benzet, O.; Colin, J. N.; Thibonnier, M.; Singlas, E.; Alexandre, J. M.; Corvol, P.; "Acute antihypertensive effect and pharmacokinetics of a tablet preparation of nifedipine." *European Journal of Clinical Pharmacology*, 24, 145-150, (1983).

Betxon, R. S.; Nathan, A. W.; Hellestrand, K. J.; Cory-Pearce, R.; Spurrell, R. J.; "The direct electrophysiological effects of nifedipine and verapamil." *Circulation*, 68, (Suppl. III): 275, (1983).

Bhargava, H.N.; Narurkar, A.; Lieb, L.M.; "Using microemulsions for drug delivery." *Pharmaceutical Technology*, 11, 46-54, (1987).

Bhatnagar, S.; Vyas, S.P.; "Organogel-based systems for transdermal delivery of propranolol." *Journal of Microencapsulation*, 11, 431-438, (1994).

Binks, B.P.; Meunier, J.; Langevin, D.; "Characteristic size, film rigidity and interfacial tensions in microemulsion systems." *Colloid and Polymer Science*, 79, 208-213, (1989).

Bogaert, M. G.; Rosseel, M. T.; Joos, R.; Boelaert, J.; "Plasma concentration of nifedipine in patients with renal failure." *Arzneimittel-Forschung*, 34, 307-308, (1984).

Bond, J.R.; Barry, B.W.; "Damaging effect of acetone on the permeability barrier of hairless mouse skin compared with that of human skin." *International Journal of Pharmaceutics*, 41, 91-93, (1988).

Bourassa, M. G.; "Haemodynamic effects of calcium ion antagonists after acute myocardial infarction." *Clinical and Investigate Medicine* 3, 81-85, (1980).

Brain, K.R.; Walters, K.A.; "Molecular modelling of skin permeation enhancement by chemical agents." En: Hadgraft, J., Walters, K.A., *Pharmaceutical skin penetration enhancement.* Marcel Dekker, Inc. New York, 389-416, (1993).

Bronaugh, D.; Stewart, R.F.; "Methods for percutaneous absorption studies in vitro IV. The flow-through diffusion cell". *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 74, 64-67 (1985).

Bronaugh, D.; Stewart, R.F.; Congdon, E.R.; "Methods for percutaneous absorption studies in vitro II. Animal models for human skin". *Toxicology and Applied Pharmacology*, 62, 481-488 (1982).

Bronaugh, R.L.; Stewart, R.F.; "Methods for in vitro skin percutaneous absorption studies III. Hydrophobic compounds." *Journal of Pharmaceutical Science*, 73, 1255-1258, (1984).

Bronaugh, R.L.; Stewart, R.F.; Storm, J.E.; "Extent of cutaneous metabolism during percutaneous absorption of xenobiotics." *Toxicology and Applied Pharmacology*, 99, 534-543, (1989).

Bronaugh, R.L.; Franz, T.J.; "Vehicle effects on percutaneous absorption: in vivo and in vitro comparisons with human skin." *British Journal of Dermatology*, 115, 1-11, (1986).

Burgess, D.J.; "Colloids and Colloid Drug Delivery Systems." En: Swarbrick, J., Boylan, J.C., *Encyclopaedia of Pharmaceutical Technology Vol. 3*. Marcel Dekker, Inc., New York, 31-63, (1994).

Calpeana, A.C.; Escribano, E.; San Martín, H.; Lauraba, J.; Obach, R.; Domenech, J.; "Influence of the formulation on the in vitro transdermal penetration of sodium diclofenac. Evaluation of topical and systemic anti-inflammatory activity in the rat." *Arzneimittelforschung*, 49, 1012-1017, (1999).

Cappel, M.J.; Kreuter, J.; "Effect of nanoparticles on transdermal drug delivery." *Journal of Microencapsulation*, 8, 369-374, (1991).

Carmines, P. K.; Mitchell, K. D.; Navar, L. G.; " Effects of calcium antagonists on renal hemodynamics and glomerular function." *Kidney International Supplement* 36, 43S-48S, (1992).

Castro, D., Moreno, M. A., Torrado, S., Lastres, J.L.; "Comparison of derivative spectrophotometric and liquid chromatographic methods for the determination of omeprazole in aqueous solution during stability studies." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 21, 291-298, (1999).

Castro, D., Moreno, M.A., Lastres, J.L.; "First-derivative spectrophotometric and LC determination of nifedipine in Brij® 96 based oil/water/oil multiple microemulsions on stability studies." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 26, 563-572, (2001).

Catz, P.; Friend, D.R.; "Transdermal delivery of levonorgestrel. VIII. Effect of enhancers on rat skin, hairless mouse skin, hairless guinea pig skin, and human skin." *International Journal of Pharmaceutics*, 58, 93-102, (1990).

Cazabat, A.M.; Langevin, D., Pouchelon, A.; "Ligth-Scattering study of water-oil microemulsion." *Journal of Colloid and Interface Science*, 73, 1-11, (1980).

Chaitman, B. R.; Wagniar, P.; Pasternac, A.; Brevers, G.; Scholl, J. M.; "Improved exercise tolerance after propranolol, diltiazem or nifedipine in angina pectoris. Comparison at 1, 3 and 8 hours and correlation with plasma drug concentration." *American Journal of Cardiology*, 53, 1-9, (1984).

Chen, L.H.; Chien, W.Y.; "Enhancement of skin permeation." En: Maddassi, S., Touitou, E., *Novel Cosmetic Delivery Systems*. Marcel Dekker, Inc. New York, 51-69, (1999).

Chiang, C.M.; Flynn, G.L.; Weiner, N.D.; Szunar, G.J.; "Bioavailability assessment of topical delivery systems: Effect of vehicle evaporation upon in vitro delivery of minoxidil from solution formulation." *International Journal of Pharmaceutics*, 55, 229-236, (1989).

Chien, Y.W.; Walia, K.H.; "Development of a dynamic skin permeation system for long term permeation studies." *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 10, 575-599, (1984).

Chien, Y.W.; Chien, T.; Bagdon, R.E.; Huang, R.E.; Bierman, R.H.; "Transdermal dual controlled-delivery of contraceptive drugs: Formulation development, in vitro and in vivo evaluations and clinical performance." *Pharmaceutical Research*, 6, 1000-1010, (1989).

Clemessey, M.; Courraze, C.; Herrenknecht, C.; "Iontophoresis, an alternative to passive transdermal delivery: analysis of physicochemical mechanism." *STP Pharma Science*, 1, 24-37, (1991).

Coldman, M.F.; Poulsen, B.J.; Higuchi, T.; "Enhancement of percutaneous absorption by the use of volatile:non volatile systems as vehicles." *Journal of Pharmaceutical Science*, 58, 1098-1102, (1969).

Covinsky, J. O.; Hamburger, S. C.; "Slow channel blockers." *Southern Medical Journal*, 76, 55-64, (1983).

Davis, A.F.; Hadgraft, J.; "Effect of supersaturation on membrane transport: I Hydrocortisone acetate." *International Journal of Pharmaceutics*, 76, 1-8, (1991).

De Vos, F.; De Muynck, M.; Geerts, M.; Remon, J.P.; "Percutaneous absorption of indomethacin form transparent Oil/Water gels in rabbits." *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 43, 237-241, (1991).

Denyer, S.P.; Guy, R.H.; Hadgraft, J.; Hugo, W.B.; "The microbial degradation of topically applied drugs." *International Journal of Pharmaceutics*, 28, 89-97, (1985).

Diez, I., Colom, H. Moreno, J., Obach, R., Peraire, C., Domenech, J.; "A comparative in vitro study of transdermal absorption of a series of calcium channel antagonists." *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 80, 931-940 (1991).

Eccleston, G.M.; "Microemulsions." En: Swarbrick, J., Boylan, J.C., *Encyclopaedia of Pharmaceutical Technology*. Vol. 9. Marcel Dekker, Inc. New York, 375-421, (1994).

El Maghrabi, G.M.; Williams, A.C.; Barry, B.W.; "Oestradiol skin delivery from ultradeformable liposomes: refinement of surfactant concentration." *International Journal of Pharmaceutics*, 196, 63-76, (2000).

El-Sayed, A. A.; Repta, A. J.; "Solubilization and stabilization of an investigational antineoplastic drug (NSC no. 278214) in an intravenous formulation using an emulsion vehicle." *International Journal of Pharmaceutics*, 13, 303-312, (1983).

Elias, P.M.; Cooper, E.R.; Korc, A.; Brown, B.E.; "Percutaneous transport in relation to stratum corneum structure and lipid composition." *Journal of Investigative Dermatology*, 76, 297-301, (1981).

Elworthy, P.H.; Patel, M.S.; "Demonstration of maximum solubilization in a polyoxyethylene alkyl ether series of non ionic surfactants." *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 34, 543-546, (1982).

Ezzedeen, F.W.; Shihab, F.A.; "Percutaneous diffusion of cefalexin, sulfametoxazole and diphenhydramine from ointments." *Pharmazie*, 45, 512-514, (1990).

Feldman, R.J.; Maibach, H.I.; "Regional variation in percutaneous penetration of ¹⁴C cortisona in man." *Journal of Investigative Dermatology*, 48, 181-183, (1967).

Feldmann, R.J.; Maibach, H.I.; "Absorption of some organic compounds through skin in man." *Journal of Investigative Dermatology*, 54, 399-404, (1970).

Ferreira, L.A.M.; Seiller, M.; Grossiord, J.L.; Marty, J.P.; Wepierre, J.; " Vehicle influence on in vitro release of metronidazole: role w/o, w/o/w, o/w multiple emulsion." *International Journal of Pharmaceutics*, 121, 169-179, (1995).

Ferreira, L.A.M.; Seiller, M.; Grossiord, J.L.; Marty, J.P.; Wepierre, J.; "In vitro percutaneous absorption of metronidazole and glucose: comparison of o/w, w/o and w/o systems." *International Journal of Pharmaceutics*, 109, 251-259, (1994a).

Février, F.; Bobin, M.F.; Fafforgue, C.; Martini, M.C.; "Advances in microemulsions and transepidermal penetration of tyrosine." *S.T.P. Pharma Sciences*, 1, 60-63, (1991).

Fisher, J.; Mack, R.; Borer, J. S.; Pickering, T.; Niarchos, A.; "Nifedipine in pulmonary hypertension: Importance of Raynaud's phenomenon" *Clinical Research*, 31, 696 A, (1983).

Flynn G.L.; Smith, E.W.; "Membrane diffusion I. Design and testing of new multifeatured diffusion cell." *Journal of Pharmaceutical Science*, 60, 1713-1717, (1971).

Fort, J.J.; Shao, Z.; Mitra, A.K., "Transport and degradation characteristics of hethotrexate dialkyl ester prodrugs across tape-stripped hairless mouse skin." *International Journal of Pharmaceutics*, 100, 233-239, (1993).

Foster, T. S.; Hamann, S. R.; Richards, V. R.; Bryant, P. J.; Graves, D. A.; McAllister Jr., R. G.; "Nifedipine kinetics and biavailability after single intravenous and oral doses in normal subjects." *Journal of Clinical Pharmacology*, 23, 161-170, (1983).

Foster, T.; Schambil, F.; von Rybinski, W.; "Production of fine disperse and long-term stable oil-in-water emulsions by the phase inversion temperature method." *Journal of Dispersion Science and Technology*, 13, 183-193, (1992).

Franqueza, M.R.; "Desarrollo galénico de una solución oral de fosfato de codeína." Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid (2000).

Franz, T.J.; "Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data." *Journal of Investigative Dermatology*, 64, 190-195 (1975).

Franz, T.J.; "The finite dose technique as a valid in vitro model for the study of percutaneous absorption." *Currents Problems in Dermatology*, 7, 58-68, (1978).

Franz, T.J.; Lehman, P.A.; "Percutaneous absorption of sulconazole nitrate in humans." *Journal of Pharmaceutical Science*, 77, 489-491, (1988).

Franz, T.J.; Lehman, P.A.; "Percutaneous absorption." En: Swarbrick, J., Boylan; J.C., *Encyclopaedia of Pharmaceutical Technology*. Vol. 11. Marcel Dekker, Inc. New York, 413-447, (1995).

Friberg, S.E.; Buraczewska, I.; Ravey, J.; "Solubilization by noionic surfactants in the HLB-temperature range." En: Mittal, K.L., *Micellization, Solubilization and Microemulsions*. Vol. 2. Plenum Press, New York, 901-911, (1977).

Friberg, S.E.; Venable, R.L.; "Microemulsions." En: Becher, P., *Encyclopaedia of Emulsion Technology*. Vol. 1. Marcel Dekker, Inc. New York, 287-336, (1983).

Friend, D.; "In vitro skin permeation techniques." *Journal of Controlled Release*, 18, 235-248, (1992).

Fromming, K-H.; Szejtli, J.; "Cyclodextrines in various drug formulations (Chapter 8)." En: Fromming, K-H.; Szejtli, J; *Cyclodextrines in Pharmacy*. Kluwer Academic Publisher, The Netherlands, 165-172, (1999).

Furlanello, F.; Disertori, M.; Vergara, G.; Del Favero, A.; "Study on the electrophysiological effects of nifedipine in man." *4th International Adalat Symposium*, 227-235, (1980).

Gangji, D.; Juvent, M.; Niset, G.; Wathieu, M; Degreve, M; "Study of influence of nifedipine on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of propranolol, metoprolol and atenolol." *British Journal of Clinical Pharmacology* 17, 29S-35S, (1984).

Gao, S.; Sing, J.; "In vitro percutaneous absorption enhancement of a lipophilic drug tamoxifen by terpenes." *Journal of Controlled Release*, 51, 193-199, (1998).

Gasco, M.; Carlotti, M.E.; Trotta, M.; "In vitro release of propranolol from oil-water microemulsions." *International Journal of Cosmetic Science*, 10, 263-269, (1988).

Gasco, M.R., G.; Gallarate, M.; Pattarino, F.; "In vitro permeation of azelaic acid from viscosized microemulsions." *International Journal of Pharmaceutics*, 63, 193-196, (1991).

Gerbacia, W.; Rosano, H.L.; "Microemulsions: formation and stabilization." *Journal of Colloid and Interface Science*, 44, 243-248, (1973).

Glass, J.M.; Stephen, R.L.; Jacobsen, S.C.; "The quantity and distribution of radiolabeled dexamethasone delivered to tissue by iontophoresis." *International Journal of Dermatology*, 19, 519-525, (1980).

Glikfeld, C.; Cullander, R.S.; Guy, H.; Guy, R.H. "New systems for in vitro studies of iontophoresis." *Pharmaceutical Research*, 5, 443-447, (1988).

Gordon, L.F.; "Topical drug absorption and topical pharmaceutical systems" En: Banker, G.S.; Rhodes, T.R., *Modern Pharmaceutics. Vol. 40*. Marcel Dekker, Inc. New York, 263-326, (1990).

Graham, N.; "Topical preparations." En: Swarbrick, J., Boylan, J.C., *Encyclopaedia of Pharmaceutical Technology. Vol. 15*. Marcel Dekker, Inc. New York, 213-239, (1995).

Greenhill, J. V.; "Photodecomposition of drugs". En: Swarbrick, J., Boylan, J. C., *Encyclopaedia of Pharmaceutical Technology. Vol. 12*. Marcel Dekker, Inc. New York, 105-136, (1995).

Grundy, J.S., Kherani, R., Foster, R.T.; "Sensitive high-performance liquid chromatography assay for nifedipine in human plasma utilizing ultraviolet detection." *Journal of Chromatography B Biomedical Application*, 654, 146-151, (1994).

Gummer, C.L., Hinz, R.S., Maibach, H.I.; "The skin penetration cell: a design update." *International Journal of Pharmaceutics*, 40, 101-104, (1987).

Guy, R.H.; Hadgraft, J.; "Selection of drugs candidates for transdermal drug delivery." En: Guy, R.H.; Hadgraft, J., *Transdermal drug delivery (Chapter 3)*. Marcel Dekker, Inc. New York, 59-81, (1989).

Guy, R.H.; Hadgraft, J.; "Physicochemical aspects of percutaneous absorption and its enhancement." *Pharmaceutical Research*, 5, 753-758, (1988).

Hadgraft, J.; Ridout, G.; "Development of model membranes for percutaneous absorption measurements. I. Isopropyl myristate". *International Journal of Pharmaceutics*, 39, 149-156 (1987).

Hamann, S. R.; McAllister Jr., R. G.; "Measurement of nifedipine in plasma by gas-liquid chromatography and electron capture detection." *Clinical Chemistry*, 29, 158-160, (1983).

Hamann, S. R.; Tan, T. G.; Kaltenborn, K. E.; Brouwer, K. L. R.; Blouin, R. A.; "Effects of phenobarbital and SKF-525^a on in vitro hepatic metabolism of verapamil and nifedipine." *Pharmacology*, 30, 121-128, (1985).

Handbook of pharmaceutical excipients. American pharmaceutical association, (1994).

Hansen, P. B.; Buch, J.; Rasmussen, O. O.; Waldorf, S.; Steiness, S.; "Influence of atenolol and nifedipine on digoxin-induced inotropism in humans." *British Journal of Clinical Pharmacology*, 18, 817-822, (1984).

Hawkins, G.S.; Refenrath, W.G.; "Influence of skin source, penetration cell fluid and partition coefficient on skin penetration." *Journal of Pharmaceutical Science*, 75, 378-381, (1986).

Higo, N.; Hinz, R.S.; Lau, D.T.; Benet, L.Z.; Guy, R.H.; "Cutaneous metabolism of nitroglycerin in vitro. I. Homogenized versus intact skin." *Pharmaceutical Research*, 9, 187-190, (1992).

Higuchi, T.; "Physical chemical analysis of percutaneous absorption process from creams and ointments." *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, 11, 85-97, (1960).

Hinz, R.S.; Hodson, C.D.; Lorence, C.R.; Guy, R.H.; "In vitro percutaneous penetration: evaluation of the utility of hairless mouse skin." *Journal of Investigative Dermatology*, 93, 87-91, (1989).

Hirasawa, K.; Shen, W. F.; Kelly, D. T.; Roubin, G.; Tateda, K.; Shibata, J.; "Effect of food ingestion on nifedipine absorption and haemodynamic response." *European Journal of Clinical Pharmacology*, 28, 105-107, (1985).

Hiroki, T.; Inoue, T.; Yoshida, T.; Arakawa, K.; "Effect of the calcium antagonistic agent nifedipine on platelet aggregation response to exercise in patients with angina pectoris." *Arzneimittel-Forschung*, 32, 1571-1574, (1982).

Ho H.; Hsiao, C.; Sheu M.; "Preparation of microemulsions using polyglycerol fatty acid esters as surfactant for delivery of protein drugs." *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85, 138-143, (1996).

Ho, H.; Huang, F.; Sokoloski, D.; Sheu, M.; "The influence of cosolvents on the in vitro percutaneous penetration of diclofenac sodium from a gel systems." *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 46, 636-642, (1994).

Hoar, T.P.; Schulman, J.H.; "Transparent water in oil dispersions: the oleopathic hydromicelle." *Nature*, 152, 102-103, (1942).

Hosoya, O.; Sano, M.; Wada, Y.; Seki, T.; "Effect of several hydrophilic polymers on the permeation of morphine and salicylic and through excised hairless rat skin." *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 46, 882-885, (1998).

Hsu, S.M.; Liu, T.K.; Yu, H.Y.; "Absorption of lidocaine following topical application in microvascular procedures in rabbits." *Journal of Orthopaedic Research*, 9, 545-549, (1991).

Idson, B.; "Percutaneous absorption." *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 64, 901-924, (1975).

Inagi, T.; Marumatsu, T., Nagai, H., Terada, H.; "Influence of vehicle composition on the penetration of indomethacin through guinea-pig skin." *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 29, 1708-1714, (1981).

Irwin, W.I.; Sanderson, F.D.; Li Wan Po, A.; "Percutaneous absorption of ibuprofen: vehicle effects on transport through rat skin." *International Journal of Pharmaceutics*, 66, 193-200, (1990).

Iwamoto, K.; Kato, T.; Kawahara, M; Koyama, N.; Watanabe, S.; Miyake, Y.; Sunamoto, J.; "Polysaccharide coated-oil droplets in oil-in water emulsions as targetable carriers for lipophilic drugs." *Journal of Pharmaceutical Science*, 80, 219-224, (1991).

Kalhweit, M.; Lessner, M.; strey, R.; "The influence of the properties of the oil and surfactant on the phase behaviour of systems of the type H₂O-oil-surfactant." *Journal of Physics and Chemistry*, 87, 5032-5040, (1983).

Kalia, N.Y.; Merino, V.; Guy, R.H.; "Transdermal drug delivery." *Dermatologic Therapy*, 16, 289-299, (1998).

Katz, M.; Shaikh, Z.I.; "Percutaneous corticoesteroid absorption correlated to partition coefficient" *Journal Pharmaceutical Sciences*, 5, 591-594, (1965).

Kimura, T.; Nagahara, N.; Hirabayashi, K.; Kurosaki, Y.; Nakayama, T.; "Enhanced percutaneous penetration of flufenamic acid using lipid disperse systems containing glycosylceramides." *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 37, 454-457, (1989).

Kirch, W.; Ohnhaus, E. E.; Hoensch, H.; Janisch, H.D.; "Ranitidine increases bioavailability of nifedipine." *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 37, 204-207, (1985).

Kleinbloesem, C. H.; van Brummelen, P.; van de Linde, J. A.; Voogd, P. J.; Breimer, D. D.; "Nifedipine kinetics and dynamics in healthy subjects." *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 35, 742-749, (1984a).

Kleinbloesem, C. H.; van Harten, J.; de Leede, L. G. J.; van Brummelen, P.; Breimer, D. D.; "Nifedipine kinetics and dynamics during rectal infusion to steady state with an osmotic system." *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 36, 396-401, (1984c).

Kleinbloesem, C. H.; van Harten, J.; van Brummelen, P.; Breimer, D. D.; "Liquid chromatography determination of nifedipine in plasma and of its main metabolite in urine." *Journal of Chromatography*, 308, 209-216, (1984b).

Knepp, V.M.; Szoka, F.C.; Guy, R.H.; "Controlled drug release from a novel liposomal delivery systems: II. Transdermal delivery characteristics." *Journal of Controlled Release*, 12, 25-30, (1990).

Kock, W.R.; Berner, B.; Burns, J.L.; Bissett, D.L.; "Preparation and characterization of a reconstituted stratum corneum film as a model membrane for skin transport." *Archives for Dermatological Research*, 280, 252-266 (1988).

Komatsu, H.; Okamoto, H.; Miyagawa, K.; "Percutaneous absorption of butylparaben from liposomes in vitro." *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 34, 3423-3430, (1986).

Kondo, S.; Kuchiki, A.; Yamamoto, K.; Akimoto, K.; Takahashi, K.; "Identification of nifedipine metabolites and their determination by gas chromatography." *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 28, 1-7 (1980).

Kondo, S.; Yamanaka, C.; Sugimoto, I.; "Enhancement of transdermal delivery by superfluous thermodynamic potential. I Thermodynamic analysis of nifedipine transport across of lipoidal barrier." *Journal of Pharmacobio-Dynamics*, 10, 587-594, (1987).

Kroneberg, G.; Krebs, R.; "Pharmacology of nifedipine." 4th *Adalat International Symposium*, 14-24, (1980).

Ktistis, G.; "A viscosity study on oil in water microemulsions." *International Journal of Pharmaceutics*, 61, 213-218 (1990).

Ktistis, G.; Niopas, I.; "A study on the in vitro percutaneous absorption of propranolol from disperse systems." *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 50, 413-418, (1998).

Kuhlmann, J.; "Effects of nifedipine and diltiazem on plasma levels and renal excretion of beta-acetyldigoxin." *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 37, 150-156, (1985).

Lalor, B.C.; Flynn, G.L.; Weiner, N.; "Formulation factors affecting release of drug from topical formulations. 1.Effect of emulsion type upon in vitro delivery of ethyl p-aminobenzoate." *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 83, 1525-1528 (1994).

Lampe, M.A.; Burlingame, A.L.; Whitney, J.A.; Williams, M.L.; Brown, B.E.; Roitman, E.; Elias, P.M.; "Human stratum corneum lipids: characterization and regional variations." *Journal of Lipid Research*, 24, 120-130, (1983).

Laugel, C.; Rafidison, P.; Potard, G.; Aguadisch, L.; Baillet, A.; "Modulated release of triterpenic compounds from an o/w/o multiple emulsion formulated with dimethicones: infrared spectrophotometric and differential calorimetric approaches." *Journal of Controlled Release*, 63, 7-17, (2000).

Lever, A. M.; Corris, P.A.; Gibson, G. J.; "Nifedipine enhances the broncodilator effect of salbutamol." *Thorax*, 39, 576-578, (1984).

Levy, D.; Kost, J.; Meshulam, Y.; Langer. R.; "Effect of ultrasound on transdermal drug delivery to rats and guinea pigs." *The Journal of Clinical Investigation*, 83, 2074-2078, (1989).

Lewis, J. G.; "Adverse reactions to calcium antagonists." *Drugs*, 25, 196-222, (1983).

Lien, E.J.; Gao, H.; "QSAR analysis of skin permeability of various drugs in man as compared to in vivo and in vitro studies in rodent." *Pharmaceutical Research*, 12, 583-587, (1995).

Lin H-H.; Hsu, L-R.; Wu, P.C.; Tsai, Y-H.; "Increased norfloxacin skin permeability for fatty alcohol propylene glycol ointment by optimized process of preparation: behaviour of stearic acid in stratum corneum lipids." *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 18, 1560-1565, (1996).

Liu, C-H.; Ho, H-O.; Hsieh, M-C.; Solokosky, T.D.; Sheu, M.T.; "Studies on the in vitro percutaneous penetration of indomethacin from gel systems in hairless mice." *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 47, 365-372, (1995).

Liu, P.; Higuchi, W.I. Ghanem, A.H.; Kurihara-Bergstrom, T.; Good, W.R.; "Assessing the influence of ethanol on simultaneously diffusion and metabolism of β -estradiol in hairless mouse skin for the asymmetric situation in vitro." *International Journal of Pharmaceutics*, 78, 123-136, (1992).

Lofdahl, C. G.; Svedmyr, K; Svedmyr, N.; "Effects of nifedipine or atenolol on ventilatory capacity and hemodynamics in asthmatic patients: Interaction with terbutaline." *Current Therapeutic Research*, 36, 282-291, (1984).

López, R.F.; Collett, J.H. Bentley, M.V.; "Influence of cyclodextrin complexation on the in vitro permeation and skin metabolism of dexamethasone." *International Journal of Pharmaceutics*, 25, 127-132, (2000).

Loth, H.; "Skin permeability." *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 11, 155-164, (1989).

Loth, H.; "Vehicular influence on transdermal drug penetration." *International Journal of Pharmaceutics*, 68, 1-10, (1991).

Mahjour, M.; Mauser, B.; Rashidbaigi, Z.; Fawzi, B.; "Effect of yolk lecithins and commercial soybean lecithins on in vitro skin permeation of drugs." *Journal of Controlled Release*, 14, 243-252, (1990).

Majeed, I.A.; Murray, W.J.; Newton, D.W.; Othman, S.; Al-Turk, W.A.; "Spectrophotometric study of the photodecomposition kinetics of nifedipine." *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 39, 1044-1046, (1987).

Majid, P. A.; De Jong, J.; "Acute hemodynamic effects of nifedipine with schemic heart disease." *Circulation*, 65, 1114-1118, (1982).

Malcolmson, C.; Lawrence, M.J.; "A comparison of the incorporation of model steroids into non-ionic micellar and microemulsion systems." *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 45, 141-145, (1993).

Malcolmson, C.; Satra, C.; Kantaria, S.; Sidhu, A.; Lawrence, M.J.; "Effect of oil on the level of solubilization of testosterone propionate into oil-in-water microemulsions." *Journal of Pharmaceutical Science*, 87, 109-116, (1998).

Marciniec, B.; Kujawa, E; Ogrodowczyk, M.; "Evaluation of nifedipine preparations by chromatographic-spectrophotometric methods". *Paharmazie*, 47, 502-504, (1992).

Marciniec, B.; Rychcik, W.; "Kinetic analysis of nifedipine photodegradation in the solid state." *Paharmazie*, 49, 894-897, (1994).

Martindale, The extra Pharmacopoeia, 31th edition, The Royal Pharmaceutical Society, London (1996).

Marzulli, F.N.; "Barriers to skin penetration." *Journal of Investigative Dermatology*, 39, 387-393, (1962).

Masini, V.; Bonte, F.; Meybeck, A.; Wepierre, J.; "Cutaneous bioavailability in hairless rats of tretinoin in liposomes or gel." *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 82, 17-21, (1993).

Maurin, B.M.; Rowe, S.M.; Bahal, S.M.; Langhans, K.L.; Hussain, M.A.; "Degradation pathways of N'-(2,4-difluorophenyl)-N-[5-(4,5-diphenyl-1H-imidazol-2-ylthiol)pentyl]-N-heptyl urea (DuP 128) in aqueous suspensions and cosolvent solutions." *Drug Stability*, 1, 112-117, (1996).

McAllister Jr., R. G.; "Nifedipine kinetics and bioavailability after single intravenous and oral doses in normal subjects." *Journal of Clinical Pharmacology* 23, 161-170, (1983).

McDaid, D.M., Deasy, P.B.; "An investigation into the transdermal delivery of nifedipine." *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 71, 253-258, (1996).

McLeod, A. A.; Jewitt, D. E.; "Drug treatment of primary pulmonary hypertension." *Drugs*, 31, 177-184, (1986).

Megrab, N.A.; Williams, A.C.; Barry, B.W.; "Oestradiol permeation through human skin and silastic membrane: effects of propylene glycol and supersaturation." *Journal of Controlled Release*, 36, 277-294, (1995).

Menzel, E.; Goldbery, S.; "pH effect of the percutaneous penetration of lignocaine hydrochloride." *Dermatologica*, 156, 8-14, (1978).

Meyer, B.R.; Kreis, W.; Eschbach, J.; "Transdermal versus subcutaneous leuprolide: a comparison of acute pharmacodynamic effect." *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 48, 340-345, (1990).

Miller, F. W.; Santoro, T. J.; "Nifedipine in the treatment of migraine headache and amaurosis fugax in patients with systemic lupus erythematosus." *New England Journal of Medicine*, 311, 921, (1984).

Mishra, B.; Pandit, J.K.; "Prolonged release of pentazocine from multiple o/w/o emulsions." *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 15, 1217-1230, (1989).

Mishra, B.; Pandit, K.; "Multiple water-oil-water emulsions as prolonged release formulations of pentazocine." *Journal of Controlled Release*, 14, 53-60, (1990).

Mitragotri, S.; Edwards, D.A.; Blankschtein, D.; Langer, R.; "A mechanistic study of ultrasonically-enhanced transdermal drug delivery." *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98, 697-701, (1995).

Miyazaki, S.; Tobiyama, T.; Takada, M.; Attwood, D.; "Percutaneous absorption of Indomethacin from Pluronic F 127 gels in rats." *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 47, 455-457, (1994).

Moeller, H.; En: Grimm, W. Y Krummen K., *Stability testing in the EC, Japan and the USA. Scientific and regulatory requirements.* W.V.G. Ed., Stuttgart, Inc., 167-176 (1993).

Mollgaard, B.; Hoelgaard, A.; "Permeation of estradiol through skin, effect of vehicles." *International Journal of Pharmaceutics*, 15, 1217-1230, (1989).

Moreno, M.A.; "Nuevas formulaciones parenterales de anfotericina B para el tratamiento de micosis sistémicas en pacientes inmunodeprimidos." Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid (2000).

Moreno, M.A., Ballesteros, M.P., Frutos, P., Lastres, J.L., Castro, D.; " Comparison of UV spectrophotometric and LC methods for the determination of nortriptyline hydrochloride in polysorbate 80 based oil/water (o/w) microemulsions." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 22, 287-294, (2000).

Moya, M.T., Domingos, C.R., Guerreiro, M.T., Morais, J.A.; "Determination of antidepressant fluoxetine in human plasma by LC with UV detection." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 23, 989-996, (2000).

Nakashima, T.; Inoki, M.; Nakanishi, Y.; "Nifedipine serum concentration; effects upon blood pressure and heart rate in normotensive volunteers." *European Journal of drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 9, 73-78, (1984).

Nairn, G.J.; "Disperse systems." En: Swarbrick, J., Boylan, J.C., *Encyclopaedia of Pharmaceutical Technology*. Vol. 4. Marcel Dekker, Inc. New York, 107-120, (1991).

Nishihata, T.; Rytting, J.H.; Kamada, A.; Matsumoto, K.; Tokahashi, K.; "Combined effect of alcohol and urea in vitro transport of indomethacin across rat dorsal skin." *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 79, 487-489, (1990).

Ochs, H. R.; Ramsch, K. D.; Verburg-Ochs, B.; Greeblatt, D. J.; Gerloff, J.; "Nifedipine kinetics and dynamics after single oral doses." *Klinische Wochenschrift* 62, 427-429, (1984).

Ogiso, T.; Shintani, M.; "Mechanism for the enhancement effect of fatty acids on the percutaneous absorption of propranolol." *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 79, 1065-1068 (1990)

Okamoto, H.; Hashida, M.; Sezaki, H.; "Effect of 1-alkyl or 1-alkenylazacycloalkanone derivatives on the penetration of drugs with different lipophilicities through guinea pig skin." *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 80, 39-45, (1991).

Okamoto, H.; Tsukahara, H.; Hashida, M.; Sezaki, H.; "Enhanced penetration of mytomicin C through hairless mouse skin and rat skin by enhancers with terpenes moieties". *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 39, 531-534 (1987).

Opie, L. H.; White, D. A.; "Adverse interaction between nifedipine and β -blockade." *British Medical Journal*, 281, 1462, (1980).

Osborne, D.W.; Middleton, C.A.; Rogers, R.L.; "Alcohol-free microemulsions" *Journal of Dispersion Science and Technology*, 9, 415-423, (1988).

Osborne, D.W.; Ward, A.J.; O'Neil, K.J.; "Microemulsions as topical drug delivery vehicles 1. characterization of a model system." *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 14, 1203-1219, (1988).

Overbeek, J.; "Microemulsions." *Proceedings of the Royal Dutch Academical Society of the Sciences*, 1, 61-69, (1986).

Parrillo, S. J.; Venditto, M.; "Elevated theophylline blood levels from institution of nifedipine therapy." *Annals of Emergency Medicine*, 13, 216-217 (1984).

Patel, M.S.; Elworthy, P.H.; Dewsnap, A.K.; "Solubilization of drugs in noionic surfactants." *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 33, 64P(Suppl.), (1981).

Pauls, W. J.; Lorrell, B. H.; Craig, W. E.; Wynne, J.; Murgo, J. P.; Gossman, W.; "Comparison of the effects of nitroprusside and nifedipine on diastolic properties in patients with hypertrophic cardiomyopathy: altered left ventricular loading or improved muscle inactivation.? *Journal of the American College of Cardiology*, 12, 123-129, (1983).

Pedregal, C.; Avendaño, C.; "Fármacos que alteran el transporte a través de las membranas celulares." En: Avendaño, C., *Introducción a la Química farmacéutica*. McGraw-Hill-Interamericana de España, 337-369, (1993).

Pershing, L.; Lambert, L.; Wright, E.D. "Topical 0.050% betamethasone dipropionate: pharmacokinetic and pharmacodynamic dose-response studies in humans". *Archives of Dermatology*, 130, 740-747, (1994).

Ponec, M.; "Reconstitution of human epidermis on de-epidermized dermis: expression of differentiation-specific protein markers and lipid composition". *Toxicology In Vitro*, 5, 597-606 (1991).

Ponec, M.; Haverkorft, M.; Soei, YL.; "Use of human keratinocytes and fibroblast cultures for toxicity studies of topically applied compounds." *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 79, 312-316 (1990).

Ponec, M.; Wauben-Penris; P.J.; Burger, A.; Kempenaar, J.; Bodeé, H.E.; "Nitroglycerin and sucrose permeability as quality markers for reconstructed human epidermis". *Skin Pharmacology*, 3, 126-135 (1990).

Poulsen, B.J.; Chowhan, Z.J.; Pritchard, R.; Katz, M.; "The use of a mixture of topical corticosteroids as a mechanism for improving total drug bioavailability: A preliminary report." *Current Problems in Dermatology*, 7, 107-120, (1978).

Prince, L.M.; "Microemulsions versus micelles." *Journal of Colloid and Interface Science*, 52, 182-188, (1975).

Prince, L.M.; "Microemulsions." *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, 23, 193-204, (1970).

Raemsch, K. D.; Sommer, J.; "Pharmacokinetics and metabolism of nifedipine." *Hypertension*, 5, II-18-II-24, (1983).

Rajagopalan, N.; Dicken, C.M.; Ravin, L.J.; Sternson, L.A.; "A study of the solubility of amphotericin B in nonaqueous solvent systems." *Journal of Parenteral and Science Technology*, 42, 97-100, (1988).

Realdon, W.; Ragazzi, E.; Dal Zotto, M.; Ragazzi, E.; "Kinetics of release and simulated absorption of methyl nicotinate from different ointment formulations: in vitro-in vivo correlations." *Pharmazie*, 51, 113-116, (1996).

Rich, S.; Kaufmann, M. D. E.; Levy, P. S.; "The effect of high doses of calcium channel blockers on survival in primary pulmonary hypertension." *New England Journal of Medicine*, 327, 76-81, (1992).

Rigg, P.C.; Barry, B.W.; "Shed snake skin and hairless mouse skin as model membranes for human skin during permeation studies". *Journal of Investigative Dermatology*, 25, 281-283 (1990).

Ritschel, W.A.; "Microemulsions for improved peptide absorption from the gastrointestinal tract." *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 13, 205-220, (1993).

Ritschel, W.A.; Birkhaus, J.K.; "Feasibility study for transdermal delivery of meperidine." *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 10, 461-466, (1988).

Ritschel, W.A.; Hussain, A.S.; "The principles of permeation substances across the skin." *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 10, 39-56, (1988).

Robbins, M.L.; "Theory of the Phase Behaviour of Microemulsions." En: Mittal, K.L., *Micellization, Solubilization and Microemulsions. Vol. 2.* Plenum Press, New York, 713-754, (1976).

Ronald, C.W.; Maibach, H.I.; "Percutaneous Absorption of drugs." *Clinical Pharmacokinetics*, 23, 253-266, (1992).

Rosano, H.L.; Carvallo, J.L.; Lyons, G.B.; "Mechanism of Formation of Six Microemulsion Systems." En: Rosano, H.L., Clausse, M., *Microemulsion Systems Vol.2.* Marcel Dekker, Inc., New York, 259-275, (1987).

Rosano, H.L.; Cavello, J.L.; Chang, D.L.; Whittam, J.H.; "Microemulsions: commentary on their preparation." *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, 39, 201-209, (1988).

Rosano, H.L.; Lan, T.; Weiss, A.; Gerbacia, W.E.F.; Whittam, J.H.; "Transparent dispersions: An investigation of some of the variables affecting their formation." *Journal of Colloid and Interface Science*, 72, 233-236, (1979).

Ruan, L.; Liang, B.; Tao, J.; Yin, C.; "Transdermal absorption of nitrendipine from adhesive patches." *Journal of Controlled Release*, 20, 231-236, (1992).

Ruckenstein, E.; "Onset of chaos in the structure of Microemulsions." En: Shah, D.O., *Macro- and Micro-emulsions*. American Chemical Society, Washington, 21-32, (1985).

Rud, T.; Andersson, K. E.; Ulmsten, U.; "Effects of nifedipine in women with unstable bladders." *Urologia Internationalis*, 34, 421-429, (1979).

Sage, B.H.; "Iontophoresis." En: Swarbrick, J., Boylan, J.C., *Encyclopaedia of Pharmaceutical Technology*. Vol. 8. Marcel Dekker, Inc. New York, 217-247, (1993).

Saint Ruth, H.; Atwood, D.; Ktistis, G., Taylor, C.J.; "Phase studies and particle size analysis of oil-in-water phospholipid microemulsions." *International Journal of Pharmaceutics*, 116, 256-261, (1995).

Santoyo, S.; Arellano, A.; Ygartua, P.; Martin, C.; "In vitro percutaneous absorption of piroxicam through synthetic membranes and abdominal rat skin." *Pharmaceutica Acta Helveticae*, 71, 141-146, (1996).

Schaefer, H.; Rodelmeier, T.E.; Benech-Kieffer, F.; "Skin and its permeability." En: Maddassi, S., Touitou, E., *Novel Cosmetic Delivery Systems*. Marcel Dekker, Inc. New York, 9-46, (1999).

Scheuplein, R.J.; "Mechanism of percutaneous absorption I. Route of penetration and the influence of the solubility." *Journal of Investigative Dermatology*, 45, 334-346, (1965).

Scheuplein, R.J.; "Mechanism of percutaneous absorption II." Transient diffusion and the relative importance of various routes of skin penetration." *Journal of Investigative Dermatology*, 48, 79-88, (1967).

Scheuplein, R.J.; Blank, I.H.; "Permeability of the skin." *Physiological Reviews*, 51, 702-747, (1971).

Schlossman, K.; Mendenwald, H.; Rosenkranz, H.; "Investigation on the metabolism and protein binding of nifedipine" *2nd International Adalat Symposium*, 33-39, (1975).

Schmalfuß, U.; Neubert, R.; Wohlrab, W.; "Modification of drug penetration into human skin using microemulsions." *Journal of Controlled Release*, 46, 279-285, (1997).

Schulman, J.H.; Mc Roberts, T.S.; Riley, D.P.; "X ray investigation of transparent oil-water systems." *Journal of Physiology*, 107, 49-50, (1948).

Schulman, J.H.; Riley, D.P.; "X ray of the structure of transparent oil-water disperse systems." *Journal of Colloid and Interface Science*, 3, 383-405, (1948).

Schulman, J.H.; Stoeckenius, W.; Prince, L.M.; "Mechanism of formation and structure of microemulsion by electron microscopy." *Journal of Physics and Chemistry*, 63, 1677-1680, (1959).

Schwartz, A.; "Molecular and cellular aspects of calcium channel antagonism." *American Journal of Cardiology*, 70, 6F-8F, (1992).

Schwarz, J.S.; Weisspapir, M.R.; Friedman, D.I.; "Enhanced transdermal delivery of diazepam by submicrom emulsion (SME) creams." *Pharmaceutical Research*, 12, 687-692, (1995).

Seki, T.; Kawaguchi, T.; Juni, K.; Sugibayashi, K.; Morimoto, Y.; "Sustained transdermal delivery of zidovudine via controlled release drugs of penetration enhancer." *Journal of Controlled Release*, 17, 41-48, (1991).

Sela, Y.; Magdassi, S.; Garti, N.; "Release of markers from the inner water phase of W/O/W emulsion stabilized by silicone based polymeric surfactants" *Journal of Controlled Release*, 33, 1-12, (1995).

Serruys, P. W.; Brower, R. W.; Katen, H. J. T.; Bom, A. H.; Hugenholtz, P. G.; "Regional wall motion from radiopaque markers after intravenous and intracoronary injections of nifedipine." *Circulation*, 63, 584-591, (1981).

Shah, A.K.; Wei, G.; Lanman, R.C.; Barghava, V.O.; Weir, S.J.; "Percutaneous absorption of ketoprofen from different anatomical sites in man." *Pharmaceutical Research*, 13, 168-172, (1996).

Shang-Yang, Y.; Yih-Yih, L.; Ko-Shao, C.; "Permeation behaviour of salbutamol through hydrophilic and hydrophobic membranes embedded by thermo-responsive cholesteryl oleyl carbonate." *Pharmaceutical Research*, 13, 914-919, (1996).

Shima, K.; Matsuska, C.; Hirose, M.; Niguchi, T.; Yamahira, Y.; "Biopharmaceutical characteristics of indomethacin gel ointment." *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 29, 2338-2343, (1981).

Shinoda, K.; Araki, M.; Sadaghiani, A.; Khan, A.; Lindman, B.; "Lecithin-based microemulsions: Phase behaviour and microemulsions." *Journal of Physics and Chemistry*, 95, 989-993, (1991).

Shinoda, K.; Friberg, S.; *Emulsions and Solubilization*. Wiley-Interscience, New York, (1986).

Shinoda, K.; Kunieda, H.; "Conditions to produced so-called microemulsions: factor to increase the mutual stability of oil and water by solubilizer." *Journal of Colloid and Interface Science*, 42, 381-387, (1973).

Shinoda, K.; Lindman, B.; "Organized surfactants systems: Microemulsions." *Langmuir*, 3, 135-149, (1987).

Siddiqui, O.; "Physicochemical, physiological and mathematical considerations in optimizing percutaneous absorption of drugs." *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 6, 1-38, (1989).

Singh, B. N.; Ellrodt, G.; Nadeemane, K.; "Calcium antagonists: Cardiocirculatory effects and therapeutic applications." En: Hurst, J.W., *Clinical Assays on the Hearth*, Vol. 2, McGraw-Hill, New York, 65-97, (1984).

Singh, B. N.; Hecht, H. S.; Nadeemane, K.; Chew, C. Y. C.; " Electrophysiological and haemodynamic actions of slow channel blocking compounds." *Progress in Cardiovascular Diseases*, 25, 103-132, (1982).

Singh, B. N.; Nadeemane, K.; Baky, S. H.; " Calcium antagonists: Clinical use in the treatment of arrhythmia." *Drugs*, 25, 125-153, (1983).

Singh, P.; Roberts, M.S.; "Iontophoretic transdermal delivery of salicylic acid and lidocaine to local subcutaneous structures." *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 82, 127-131, (1993).

Snedden, W.; Fernández, P. G.; Kim, B. K.; " Specific assay for serum nifedipine with co-administered drugs in normo- and hypertensives." *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 35, 276, (1984b).

Southwell, D.; K.B.; Barry, B.W.; "Penetration enhancers for human skin: mode of action of 2-pyrrolidone and dymetilformamide on partition and diffusion of model compounds water, n-alcohols, and caffeine." *Journal of Investigative Dermatology Science*, 80, 507-514, (1983).

Southwell, D.; Barry, B.W.; Woodford, R.; "Variations in permeability of human skin within and between specimens". *International Journal of Pharmaceutics*, 18, 299-304 (1984).

Spital, A.; Scandling, J. D.; "Nifedipine in continuous ambulatory peritoneal dialysis." *Archives of International Medicine*, 143, 2025, (1983).

Stability testing of new drug substances and products, 1999, International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. <http://www.eudra.org/emea.html>

Stern, Z.; Zylber-Katz, E.; Levy, M.; "Nifedipine plasma concentrations in patients treated for angina pectoris." *International Journal of Clinical Pharmacology Therapy and Toxicology*, 22, 198-203, (1984).

Swarbrick, J.; Lee, J.; Brom, J.; "Drug permeation through human skin: I. Effect of storage conditions of skin." *Journal of Investigative Dermatology*, 78, 63-66, (1982).

Syed Laik Ali; "Nifedipine." En: Florey, K., *Analytical profiles of drugs substances*. Academic Press, Inc., San Diego (California), 221-288 (1989).

Taburet, A. M.; Singles, E.; Colin, J-N.; Benzet, O.; Thiobonnie, M.; Corvol, P.; "Pharmacokinetic studies of nifedipine tablet. Correlation with antihypertensive effects." *Hypertension*, 5, II-29-II-33, (1983).

Tachibana, K.; "Transdermal delivery of insulin to alloxan-diabetic rabbits by ultrasound exposure." *Pharmaceutical Research*, 9, 952-954 (1992).

Tang-Liu, D.; Neff, J.; Zolezio, H.; Sandri, R, A.; "Percutaneous and systemic disposition of hexamethylene lauramide and its penetration enhancement effect on hydrocortisone in rat sandwich skin-flap model". *Pharmaceutical Research*, 5, 477-481, (1988).

Tarr, B.; Yalkowsky, S.M.; "Enhanced intestinal absorption of cyclosporine in rats through the reduction of emulsion droplet size." *Pharmaceutical Research*, 6, 40-46, (1989).

Terry, R. W.; "Nifedipine therapy in angina pectoris: Evaluation of safety and side effects." *American Heart Journal* 104, 681-689, (1982).

Thacharodi, D.; Panduranga, R.; "Transdermal absorption of nifedipine from microemulsions of lipophilic skin penetration enhancers." *International Journal of Pharmaceutics*, 111, 215-240, (1994).

Theeuwes, F; Wong, P.S.L.; Yum, S.I.; "Drug delivery and therapeutic systems." En: Swarbrick, J., Boylan, J.C., *Encyclopaedia of Pharmaceutical Technology*. Vol. 4. Marcel Dekker, Inc. New York, 303-348, (1991).

Theroux, D.; Waters, D. D.; Debaisieux, J. C.; Szlachcic, J.; Micgala, H. F.; Traube, M.; Hongo, M.; Magyar, L.; McCullum, R. W.; "Effects of plasma levels of nifedipine and cardiovascular effects after sublingual dosing in normal subjects." *Journal of Clinical Pharmacology*, 25, 125-129, (1985).

Tojo, K; Masi, J.A.; Cien, Y.W.; "Hydrodynamic characteristics of an in vitro drug permeation cell." *Industrial Engineering Chemical Fundamentals*, 24, 368-373, (1985).

Tregear, R.T.; "The permeability of skin to albumin, dextrans and polyvinyl pyrrolidone." *Journal of Investigative Dermatology*, 66, 24-27, (1966).

Trotta, M.; Morel, S.; Gasco, M.R.; "Effect of the oil phase composition on the skin penetration of felodipine from o/w microemulsions." *Pharmazie*, 52, 50-53, (1997).

Tsai, G.C.; Hsu, L.R.; Fang, J.Y.; Linn, H.H.; "Chitosan hydrogel as a base for transdermal delivery of berberine its evaluation in rat skin." *Biological Pharmaceutical Bulletin*, 22, 397-401, (1999).

Tsien, R. W.; Lipscombe, D.; Madison, D. V.; Bley, K. R.; Fox, A. P.; Multiples types of neuronal calcium channels and their selective modulation." *Trends in Neuroscience*, 11, 431-438, (1988).

Tyle, P.; Agrawala, P.; Blankschtein, D.; Langer, R.; "Drug delivery by sonophoresis." *Pharmaceutical Research*, 6, 355-361, (1989).

Uekama, K.; Otagiri, M.; Sakai, A.; Irie, T.; Matsuo, N.; Matsuoka, Y.; "Improvement in the percutaneous absorption of beclomethasone dipropionate by gamma cyclodextrin complexation." *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 37, 532-535, (1985).

Vaghy, P. L.; "Calcium antagonists (Chapter 18)." En: Brody, T. M., Kenneth, J. L., Minneman, P., *Human Pharmacology. Molecular to Clinical*. Mosby-Year Book, Inc., St. Louis, 227-237, (1998).

Valenta, C.; Wanka, M.; Heidlas, J.; "Evaluation of novel soya-lecithin formulations for dermal use containing ketoprofen as a model drug." *Journal of Controlled Release*, 63, 165-173, (2000).

Vermiere, A.; De Muynck, C.; Vandenbossche, G.; Bechaute, W.; Geerts, M.; Remon, J.P.; "Sucrose laurate gels as a percutaneous delivery system for oestradiol in rabbits." *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 48, 463-467, (1996).

Vora, B.; Khopade, A.J.; Jain, N.K.; "Proniosome based transdermal delivery of levonorgestrel for effective contraception." *Journal of Controlled Release*, 54, 149-165, (1998).

Waller, D. G.; Renwick, A. G.; Gruchy, B. S.; George, C. F.; "The first pass metabolism of nifedipine in man." *British Journal of Clinical Pharmacology* 18, 951-954, (1984b).

Walsh, R. A.; O'Rourke, R. A.; "Direct and indirect effects of calcium entry blocking agents on isovolumic left ventricular relaxation in conscious dogs." *Journal of Clinical Investigation*, 75, 1426-1434, (1985).

Walters, K.; "Transdermal drug delivery systems." En: Swarbrick, J., Boylan, J.C., *Encyclopaedia of Pharmaceutical Technology. Vol. 15*. Marcel Dekker, Inc. New York, 253-292, (1995).

Washitake, M.; Takashima, Y.; Tanaka, S.; Tanaka I.; "Drug permeation through egg shell membranes." *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 28, 2855-2861, (1980).

Wester, R.C.; Noonan, P.K.; Smeach, S.; Kosobud, L.; "Pharmacokinetics and bioavailability intravenous and topical nitroglycerin in rhesus monkey. Estimate of percutaneous first-pass metabolism." *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 72, 745-748, (1983).

Whitton, J.T.; Erevall, J.D.; "The thickness of the epidermis." *British Journal of Dermatology*, 89, 467-476, (1973).

Williams, A.C.; Barry, B.W.; "Correlation of differential scanning calorimetric parameters with skin penetration enhancing activity of terpenes." *Pharmaceutical Research*, 7(Suppl.), 112-118, (1990).

Willimann, H.; Walde, P.; Luisi, P.L.; Gazzaniga, A.; Stroppolo, F.; "Lecithin organogel as matrix for transdermal transport of drugs." *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 81, 871-874, (1992).

Winsor, P.A.; "Hydrotropy, solubilization and related emulsification processes part I." *Trans Faraday Society*, 44, 376-398, (1948).

Yamaguchi, T.; Nishizaki, H.; Itai, S.; Hayashi, H.; Ohshima, H.; "Physicochemical characterization of parenteral lipid emulsion: influence of cosurfactants on flocculation and coalescence." *Pharmaceutical Research*, 1273-1278, (1995).

Yardley, H.J.; Summerly, S.; "Lipid composition and metabolism in normal and diseased epidermis." *Pharmacology and Therapeutics*, 13, 357-383, (1981).

Yu, D.; Sanders, L.M.; Davidson, G.W.; Marvin, M.J.; Ling, T.; "Percutaneous absorption of nicardipine and ketorolac in rhesus monkeys." *Pharmaceutical Research*, 5, 547-562, (1988).

Ziegenmeyer, J.; Fhürer, C.; "Mikroemulsionen als topische." *Arzneiform Acta Pharmaceutical Technology*, 26, 273-277, (1980).

